



FUNDAÇÃO UNIVERSIDADE FEDERAL DE RONDÔNIA
NÚCLEO DE SAÚDE
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM BIOLOGIA EXPERIMENTAL

JOSÉ RIBEIRO DE OLIVEIRA

COLONIZAÇÃO E SUSCETIBILIDADE AOS ANTIMICROBIANOS DE *Streptococcus pneumoniae* ISOLADOS DA NASOFARINGE DE CRIANÇAS COM INFECÇÕES RESPIRATÓRIAS AGUDAS NA REGIÃO DE PORTO VELHO-RO

PORTO VELHO-RO
2015

JOSÉ RIBEIRO DE OLIVEIRA

COLONIZAÇÃO E SUSCETIBILIDADE AOS ANTIMICROBIANOS DE *Streptococcus pneumoniae* ISOLADOS DA NASOFARINGE DE CRIANÇAS COM INFECÇÕES RESPIRATÓRIAS AGUDAS NA REGIÃO DE PORTO VELHO-RO

Dissertação de Mestrado apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Biologia Experimental – PGBIOEXP, da Universidade Federal de Rondônia – UNIR para defesa, a fim de obter título de Mestre em Biologia Experimental.

Área de concentração: Microbiologia

Orientadora: Dr^a Najla Benevides Matos

**PORTO VELHO-RO
2015**

JOSÉ RIBEIRO DE OLIVEIRA

COLONIZAÇÃO E SUSCETIBILIDADE AOS ANTIMICROBIANOS DE *Streptococcus pneumoniae* ISOLADOS DA NASOFARINGE DE CRIANÇAS COM INFECÇÕES RESPIRATÓRIAS AGUDAS NA REGIÃO DE PORTO VELHO-RO

Defesa de dissertação apresentada ao Programa de Pós-graduação em Biologia Experimental – PGBIOEXP, do Núcleo de Saúde da Universidade Federal de Rondônia – UNIR para obtenção de título de Mestre, em sessão pública realizada em 14 de abril de 2015.

Banca Examinadora



Presidente: Dr.^a Najla Benevides Matos

1º Titular: Dr.^a Patrícia Puccinelli Orlandi

2º Titular: Dr.^a Leidiane Amorim Soares

FICHA CATALOGRÁFICA
BIBLIOTECA PROF. ROBERTO DUARTE PIRES

Oliveira, José Ribeiro de.

O482c

Colonização e suscetibilidade aos antimicrobianos de *Streptococcus pneumoniae* isolados da nasofaringe de criança com infecções respiratórias aguda na região de Porto velho-RO./ José Ribeiro de Oliveira, Porto Velho, 2015

97f; il.

Dissertação (Mestrado em Biologia Experimental) – Fundação Universidade Federal de Rondônia, Porto Velho, 2015.

1. *Streptococcus pneumoniae*. 2. Colonização. 3. Nasofaringe. 4. Resistência. I. Fundação Universidade Federal de Rondônia. II. Título.

CDU: 579.862

Bibliotecária responsável: Luã Silva Mendonça – CRB11/905

Dedico aos meus pais João Ribeiro “*in memorian*” e Dona Josefa por lutarem pela
minha educação.

A minha esposa Marilete Buratti pelo incentivo e compreensão.

Aos meus filhos João Gabriel, Gabriela e Bianca pelo apoio.

A minha orientadora Dr^a Najla Benevides Matos pela oportunidade concedida.

Dedico-lhes essa conquista com gratidão.

AGRADECIMENTOS

Agradeço primeiramente a Deus, pela integridade da minha saúde, pela sabedoria nos momentos de decisão e pela companhia nos momentos de solidão. A Sua graça me permitiu chegar até aqui.

À Professora Doutora Najla Benevides Matos, minha orientadora, pela oportunidade que me foi concedida. Pelo exemplo de pesquisadora com incessante busca por conhecimento. Por sua capacidade visionária e por cada momento compartilhado que me permitiram valiosos aprendizados. A ela, todo meu respeito e admiração.

A todos os professores do programa de pós graduação, por compartilharem seus conhecimentos.

A Núcia Cristiane por toda a paciência de me ensinar os procedimentos, preparação de meios e de me chamar a atenção sempre que necessário, para que o resultado final fosse de excelência. Muito obrigado Cris, continue assim!

Ao Esquerdo que nos momentos de pressão e stress fez com que o clima fosse amenizado, pois com ele as coisas são resolvidas. Obrigado pelas palavras de incentivo, pelo apoio nos momentos difíceis e por passar um pouco do seu conhecimento.

Ao Dyones que contribuiu diversas vezes com experimentos (reisolamentos, extrações, biofilmes, antibiogramas, etc.), muito obrigado.

A Renata e ao Ronelson equipe da secretaria do CEPEN, pela disposição em ajudar nos momentos necessários.

Ao pessoal da sala de lavagem Kiki, Dona Nair e Odair. Agradeço pela paciência, pelo preparo dos meios de cultura e dos materiais. Muito obrigado.

Ao Roger Lafontaine pelo auxílio nas análises estatística. Obrigado, você é o cara.

A professora Joana pelo apoio, incentivo e dicas. Muito obrigado!

“Ergo os olhos para os montes: de onde virá o meu socorro? O meu socorro vem de Javé, que fez o céu e a terra”.

(Salmo 121-1-2)

RESUMO

Streptococcus pneumoniae um importante agente causal de morbidade e mortalidade em indivíduos de todas as idades. *S. pneumoniae* coloniza a orofaringe de pessoas saudáveis, consideradas portadores assintomáticos. O estado de portador assintomático está relacionado ao surgimento de doença invasiva, pois pode haver invasão de estruturas adjacentes, como a orelha média, os seios paranasais, as meninges e a corrente sanguínea. A bactéria ganha acesso ao hospedeiro através da colonização da nasofaringe, que representa um importante reservatório para a transmissão deste patógeno, contribuindo para a disseminação horizontal entre os indivíduos. *S. pneumoniae* está associado a uma elevada taxa de morbidade e mortalidade, sobretudo em crianças menores de 5 anos. No presente estudo procuramos caracterizar o perfil de colonização da nasofaringe por *S. pneumoniae* em crianças de 0 a 6 anos de idade atendidas no Hospital Cosme e Damião na cidade de Porto Velho-RO, com infecções respiratória aguda-IRA, no período de fevereiro a dezembro de 2013. Um total de 660 swabs foram coletados entre as crianças consideradas elegíveis para o estudo. Para caracterização dos isolados foram realizados testes moleculares e bioquímicos e foram realizados testes de sensibilidade aos antimicrobianos (TSA) e E-test, teste para capacidade de formação de biofilme e teste moleculares para identificação dos sorotipos. A taxa de colonização por *S. pneumoniae* encontrada foi de 8,9% (59/660). Neste estudo verificou-se uma elevada frequência de resistência aos antibióticos Trimetoprima (TRI) 76,3% (45/59) dos isolados, Oxacilina (OXA) com 52,5% (31/59) dos isolados e Azitromicina (AZI) 37,2% (22/59) dos isolados. Os antibióticos Vancomicina (VAN), Cloranfenicol (CLO), Rifampicina (RIF), Clindamicina (CLI) e Tetraciclina (TET) apresentaram alta sensibilidade 100% (59/59), 98,3% (58/59), 93,2% (55/59), 86,4% (51/59) e 67,7% (40/59) respectivamente. A concentração inibitória mínima revelou que 88,1% (52/59) das amostras foram sensíveis a penicilina, 10,2% (06/59) apresentaram resistência intermediária e 1,7% (01/59) resistência plena. Testados 12 sorotipos sendo: 1, 3, 4, 5, 6A/B, 7A, 9V, 14, 18C, 19A, 19F e 23F foi identificado a presença do sorotipo 9V em uma amostra e 19F em oito amostras, respectivamente 1,7% e 13,6%. Quanto a capacidade de formação de biofilme, 71,2% (42/59) dos isolados apresentaram um fenótipo fortemente aderente (FMA), 15,3% (9/59) fracamente aderente (FCA) e 13,5% (8/59) foram não aderentes (NA). Correlacionados os fatores socioeconômicos, ambientais e coinfeção com rinovírus e parainfluenza, foram estatisticamente significantes a presença de fumante e associação entre asma e fumo ($p > 0,028$), período de maior pluviosidade ($p > 0,0001$) e presença do rinovírus em 32,69% dos isolados ($p = 0,0425$). O estudo ressalta a importância de um contínuo monitoramento do perfil de resistência, dos sorotipos circulantes e da capacidade de formação de biofilme na colonização nasofaríngea por *S. pneumoniae*, pois são fatores que podem favorecer a persistência bacteriana e causar sérios danos ao hospedeiro.

PALAVRAS-CHAVE: *Streptococcus pneumoniae*, colonização, nasofaringe, resistência, biofilme.

ABSTRACT

Streptococcus pneumoniae an important causal agent of morbidity and mortality in individuals of all ages. *S. pneumoniae* colonizes the oropharynx of healthy people, considered asymptomatic carriers. The asymptomatic carrier state is related to the development of invasive disease, as there may be invasion of adjacent structures such as the middle ear, the paranasal sinuses, the meninges and the blood. The bacteria gain access to the host through the nasopharyngeal colonization, which is an important reservoir for the transmission of this pathogen contributing to the horizontal spread between individuals. Is associated with a high rate of morbidity and mortality, especially in children under 5 years. In the present study aimed to characterize the profile of nasopharyngeal colonization by *S. pneumoniae* in children 0-6 years of age treated at Cosmas and Damian Hospital in the city of Porto Velho, RO, with acute respiratory infections-IRA, from February to December 2013. A total of 660 swabs were collected from children eligible for the study. For characterization of isolates were conducted molecular and biochemical and susceptibility testing were performed antimicrobial (TSA) and E-test, phenotypic testing, test for biofilm formation capacity and molecular test to identify serotypes. After testing the rate of colonization by *S. pneumoniae* found was 8.9% (59/660) considerably below that found in other studies. In this study there was a high incidence of antibiotic resistance TRI 45/59 (76.3%) isolates, OXA with 31/59 (52.5%) isolates and AZI 22/59 (37.2%) of isolated. VAN antibiotics, CLO, RIF, CLI and TET showed high sensitivity 59/59 (100%), 58/59 (98.3%), 55/59 (93.2%), 51/59 (86.4%) and 40/59 (67.7%), respectively. The minimum inhibitory concentration revealed that 88.1% of strains were susceptible to penicillin, 10.2% had intermediate resistance and 1.7% full resistance. 12 being tested serotypes 1, 3, 4, 5, 6A / B and 7A, 9V, 14, 18C, 19A, 19F and 23F was identified the presence of serotype 9V and 19F in a sample of the eight samples, respectively 1.7 % and 13.6%. The biofilm formation capacity, 42 isolates (71.2%) had a strong adherent phenotype (FMA), 9 (15.3%) poorly adherent (FCA) and 8 (13.5%) were nonadherent (NA). Correlated socioeconomic and environmental factors and co-infection with rhinovirus and parainfluenza, were statistically significant the presence of smokers and association between asthma and smoking ($p > 0.028$), higher rainfall period ($p > 0.0001$) and presence of rhinovirus in 32, 69% of the isolates ($P = 0.0425$). The study highlights the importance of a continuous monitoring of the resistance profile of the circulating serotypes and biofilm formation capacity in nasopharyngeal colonization by *S. pneumoniae*, as are factors that can encourage bacterial persistence and cause serious damage to the host.

KEY WORDS: *Streptococcus pneumoniae* colonization, nasopharynx, resistance, biofilm.

LISTA DE ILUSTRAÇÕES

Figura 1 - Coloração de Gram e características macroscópicas de colônia de pneumococo em cultivo em Agar sangue.	21
Figura 2 - Rota da infecção causada por <i>S. pneumoniae</i>	22
Figura 3 - Fatores de virulência pneumocócica	23
Figura 4 - Interação entre <i>S. pneumoniae</i> e células epiteliais humanas	27
Figura 5 - Microscopia eletrônica de varredura de baixa temperatura-LTSEM.....	34
Figura 6 - Relação entre as crianças colonizadas e a precipitação pluviométrica.....	58
Figura 7 - Teste fenotípico para detecção de sensibilidade aos antimicrobianos (TSA) nos isolados de <i>S. pneumoniae</i> oriundos de crianças de 0 a 5 anos, com IRA em Porto Velho/RO.	60
Figura 8 - Resultado do teste de formação de biofilme por espectrofotometria em isolados de <i>S. pneumoniae</i>	61
Figura 9 - Capacidade de formação de biofilme dos isolados de <i>S. pneumoniae</i> oriundos de crianças de 0 a 6 anos, com IRA em Porto Velho/RO.	62

LISTA DE TABELAS

Tabela 1 - Taxa de prevalência de <i>Streptococcus pneumoniae</i>	29
Tabela 2 - Diâmetro do halo de inibição para cada classe de antibiótico testado, de acordo com as recomendações do CLSI (2013)	48
Tabela 3 - Sequências de primer utilizados para amplificação dos sorotipos.	53
Tabela 4 - Resultados do sequenciamento do gene ribossomal 16S	54
Tabela 5 - Resultados dos isolados identificados de <i>Streptococcus sp.</i>	55
Tabela 6 - Características sociodemográficas da população de estudo.	56
Tabela 7 - Distribuição das crianças colonizadas e não colonizadas pelo <i>S. pneumoniae</i> em relação à presença de fatores de risco como aglomeração familiar e onde a criança passa a maior parte do tempo.	56
Tabela 8 - Distribuição das crianças colonizadas e não colonizadas pelo <i>S. pneumoniae</i> em relação à presença de fatores de risco como grau de instrução da mãe e renda familiar.....	57
Tabela 9 - Distribuição das crianças colonizadas e não colonizadas pelo <i>S. Pneumoniae</i> em relação à presença de fator de risco antecedentes familiares.....	58
Tabela 10 - Perfil de susceptibilidade aos antimicrobianos dos 59 isolados de <i>S. pneumoniae</i> isolados de crianças com IRA pelo método de difusão de disco.	59
Tabela 11 - Perfil de susceptibilidade aos antimicrobianos dos 59 isolados de <i>S. pneumoniae</i> isolados de crianças com IRA pelo método de E-test.....	60
Tabela 12 - Perfil dos sorotipos testados nas 59 amostras de <i>S. pneumoniae</i> isolados de crianças com IRA.	63

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

AZI – Azitromicina

CBPs – Proteínas ligadoras de colina

CIM – Concentração inibitória mínima

CLI - Clindamicina

CLO – Cloranfenicol

DO – Densidade óptica

EAEC – *E. coli* enteroagregativa

EPS – Substâncias poliméricas extracelulares

EUA – Estados Unidos da América

Fab – Fragmento ligador de antígeno

FCA – Fracamente aderente

FMA – Fortemente aderente

HICD – Hospital Infantil Cosme e Damião

I – Intermediário

IRA – Infecção respiratória aguda

LTSEM – Microscopia eletrônica de varredura de baixa temperatura

Lyt A – Autolisina A

NA – Não aderente

OMS – Organização Mundial de Saúde

OXA – Oxacilina

PCR – Reação em cadeia da polimerase

PNSP – Pneumococo Não-Susceptível a Penicilina

PspA – Proteína A de superfície pneumocócica

PspC – Proteína C de superfície pneumocócica

R – Resistente

RIF - Rifampicina

S – Sensível

SDS - Dodecil sulfato de sódio

SUS – Sistema único de saúde

SpNT – *Streptococcus pneumoniae* não tipáveis

TET – Tetraciclina

TRI – Trimetropime

TRO – Terapia de reidratação oral

TSA – Teste de sensibilidade aos antimicrobianos

UFCs – Unidades formadoras de colônias

UTIP – Unidade de Terapia Intensiva Pediátrica

UV - Ultravioleta

VAN - Vancomicina

SUMÁRIO

1 INTRODUÇÃO	16
1.1 EPIDEMIOLOGIA	17
1.2 ASPECTOS GERAIS DO <i>Streptococcus pneumoniae</i>	19
1.3 HISTÓRIA DA DESCOBERTA DO <i>Streptococcus pneumoniae</i>	20
1.4 CARACTERIZAÇÃO MORFOLÓGICA DO <i>Streptococcus pneumoniae</i>	20
1.5 COLONIZAÇÃO POR <i>S. pneumoniae</i>	21
1.6 FATORES DE VIRULÊNCIA E MECANISMO DE PATOGENICIDADE	23
1.6.1 Cápsula polissacarídica	24
1.6.2 Pneumolisina	24
1.6.3 Hialuronidase	25
1.7 Mecanismo de colonização	25
1.8 PREVALÊNCIA DE PORTADOR DE <i>Streptococcus pneumoniae</i> E SOROTIPOS	28
1.9 <i>Streptococcus pneumoniae</i> E A SUSCEPTIBILIDADE AOS ANTIMICROBIANOS	30
1.11 A FORMAÇÃO DO BIOFILME EM <i>S. pneumoniae</i>	31
1.12 VACINAS PNEUMOCÓCICAS	34
2 JUSTIFICATIVA	37
3 OBJETIVOS	38
3.1 OBJETIVO GERAL	38
3.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS	38
4 METODOLOGIA	39
4.1 LOCAL DO ESTUDO E POPULAÇÃO ESTUDADA	39
4.1.1 Critérios de inclusão	39
4.1.2 critérios de exclusão	39
4.1.3 Aspectos éticos	40
4.2 COLETA E REGISTRO DE DADOS	40
4.3 PROCEDIMENTOS DA COLETA E TRANSPORTE DA AMOSTRA	40
4.4 TRATAMENTO DA AMOSTRA	41

4.5 REAÇÃO EM CADEIA POLIMERASE PARA AMPLIFICAÇÃO DO GENE RIBOSSOMAL 16S	41
4.6 PURIFICAÇÃO DO PRODUTO DA PCR.....	42
4.8 COMPARAÇÃO DA SEQUÊNCIA COM O PROGRAMA HUMAN ORAL MICROBIOME DATABASE (HOMD).....	43
4.9 IDENTIFICAÇÃO BIOQUÍMICA DAS AMOSTRAS SEQUENCIADAS	43
4.9.1 Caracterização morfológica	43
4.9.2 DETERMINAÇÃO DA ATIVIDADE HEMOLÍTICA E CATALÍTICA	44
4.9.3 Teste de susceptibilidade à optoquina e bacitracina.....	44
4.9.4 Teste de bile solubilidade	45
4.9.5 Teste bile esculina	45
4.9.6 Teste CAMP	46
4.10 TESTES DE SUSCEPTIBILIDADE AOS ANTIMICROBIANOS (TSA)	46
4.10.1 Teste de difusão em disco	46
4.10.2 Determinação da cim pela técnica de E-TEST (<i>Epsilometer Test</i>)	48
4.11 DETECÇÃO DE BIOFILME POR ESPECTROFOTOMETRIA.....	49
4.12 EXTRAÇÃO DE DNA GENÔMICO	50
4.13 SOROTIPAGEM DE <i>S. pneumoniae</i> ATRAVÉS DE MULTIPLEX PCR.....	52
4.14 ELETROFORESE	52
4.15 ANÁLISE ESTATÍSTICA.....	52
5.0 RESULTADOS	54
5.1 FREQUÊNCIA DOS ISOLADOS DE <i>S. pneumoniae</i>	54
5.2 CARACTERÍSTICAS EPIDEMIOLÓGICAS DOS PORTADORES DE <i>S. pneumoniae</i>	55
5.3 PERFIL DE SUSCEPTIBILIDADE AOS ANTIMICROBIANOS.....	59
5.4 CAPACIDADE DE FORMAÇÃO DE BIOFILME POR ESPECTROFOTOMETRIA.....	61
5.5 CORRELAÇÃO ENTRE A RESISTÊNCIA AOS ANTIBIÓTICOS E FORMAÇÃO DE BIOFILME	62
5.6 CARACTERIZAÇÃO DOS SOROGRUPOS/SOROTIPOS	62
5.7 CORRELAÇÃO ENTRE PRESENÇA DE <i>S. pneumoniae</i> , <i>Rinovírus</i> e <i>Parainfluenza Humano</i> (HPIV-1).....	63
6.0 DISCUSSÃO	64

CONCLUSÃO	72
REFERÊNCIAS	73
ANEXOS.....	92
ANEXO I	93
ANEXO II	94
ANEXO III	96

1 INTRODUÇÃO

De acordo com Bellos e colaboradores (2010), as IRA são classificadas como infecções do trato respiratório superior, também denominada infecção da via aérea superior (IVAS) e infecções do trato respiratório inferior ou infecção da via área inferior (IVAI).

As IRA estão entre as principais causas de mortalidade e morbidade infantil em todo o mundo, atingindo principalmente crianças menores de cinco anos de idade (TCHIDJOU et al., 2010), em países em desenvolvimento (WHO, 2013).

As IRA, causam 19% de todas as mortes em crianças menores de 5 anos em todo o mundo, estando entre as três mais frequentes causas de mortalidade no primeiro ano de vida (cerca de 80% destas por Pneumonia e Gripe), sendo superadas apenas pelas afecções perinatais e doença diarreica aguda (WHO, 2012).

Em relação aos fatores de risco para as IRA, em linhas gerais são descritos: o baixo nível socioeconômico (VICTORA et al., 1994), condições ambientais inadequadas, incluindo aglomeração familiar (PRIETSCH et al., 2002) e exposição passiva ao fumo (FISCHER et al., 2002; PRIETSCH et al., 2002), são apontados como os principais fatores de risco envolvidos na ocorrência das doenças respiratórias na infância. Além desses aspectos, há aqueles relacionados às condições nutricionais (baixo peso ao nascer, baixo peso e estatura para a idade e interrupção da amamentação) e a presença de doenças respiratórias pré-existentes na criança (POST et al., 1992).

A IRA abrange amplo espectro de manifestações clínicas como coriza, dor de garganta, otalgia, tosse e dificuldade para respirar que se relacionam com o diagnóstico de resfriados comum, laringotraqueobronquite, bronquite, bronquiolite e pneumonia (FAÇANHA et al, 2004).

Estas infecções são ainda responsáveis por 30 a 60% dos atendimentos ambulatoriais pediátricos e por até 10% das internações de crianças (SALVADOR et al., 2011). Estes índices se mostram maiores em alguns estudos, podendo chegar a 42% de representação das patologias respiratórias infecciosas dentro de um universo de atendimento pediátrico (SALGADO; AGUERO, 2010).

Entre os principais agentes etiológicos responsáveis pelas IRA estão, o vírus Sincicial Respiratório (RSV), Rhinovirus humano (HRV), Influenza (FLU), Metapneumovírus (HMPV), Adenovírus humano, Bocavirus, Parainfluenza humano (HPIV), Chlamydomphila pneumoniae, Mycoplasma pneumoniae, Staphylococcus aureus, Streptococcus pyogenes, Streptococcus pneumoniae (WHO, 2009; PAVIA, 2011).

1.1 EPIDEMIOLOGIA

Estudos demonstram que nas últimas décadas houve um elevado índice de internações referentes a infecções do aparelho respiratório no Brasil. Dados do Ministério da Saúde (2010) demonstraram que nesse mesmo ano ocorreram 1.450.653 internações por doenças do aparelho respiratório no país, com um impacto importante na faixa etária pediátrica, sendo internadas 664.203 crianças menores de 14 anos, o que representou 46% do valor total dessas internações no Sistema Único de Saúde (SUS) nesse ano base.

De acordo com estudos de Baker e colaboradores (2012) as doenças do trato respiratório inferior foram as que mais contribuíram para o aumento de 51% nas hospitalizações por doenças infecciosas registrados na Nova Zelândia, de 1998 a 2008, e pessoas de algumas etnias e que residiam em bairros pobres foram mais propensas a internações por estas formas de Doenças do Aparelho Respiratório (DAR). A importância de fatores socioeconômicos na determinação das IRA tem sido apontada em vários estudos. Por exemplo, foi demonstrado que famílias de baixo nível socioeconômico em Passo Fundo-RS apresentavam risco para hospitalização por pneumonia seis vezes maior aquelas de estrato social mais elevado (GEID et al., 2007).

De 2008 a 2011 as DAR no Brasil, foram responsáveis por 34,5% do total de internações hospitalares, pelo SUS, em crianças menores de um ano, e por 43,2% em crianças de um a quatro anos, representando a primeira causa das hospitalizações nesse período, quando comparadas com as demais causas, em todas as regiões do Brasil. Na região Norte, as DAR foram a primeiras causas de

hospitalizações de menores de 1 anos, nesse mesmo período. No Nordeste e Sul foram as primeiras causas nos anos de 2008 e 2009 e segunda em 2010 e 2011; para a região Sudeste, foi a segunda causa de hospitalização nos anos de 2008 a 2011 (SIH/SUS).

De acordo com (BENGUIGUI, 2003), embora até o século XX a mortalidade por IRA tenha diminuído, milhares de crianças continuam morrendo por essas causas. Nesse contexto, as metas da Organização Mundial da Saúde (OMS) apresentadas à Organização das Nações Unidas (ONU) para 2015, denominadas metas para o milênio, representam um grande desafio para o mundo e, conseqüentemente, para as políticas nacionais e pesquisas em saúde no Brasil. De acordo com Relatório Nacional de Acompanhamento dos Objetivos de Desenvolvimento do Milênio, em 2005, as infecções do aparelho respiratório foram a terceira causa de óbito mais frequente no Brasil, o que requer a intensificação dos esforços para modificar essa situação (MINISTÉRIO DO PLANEJAMENTO, ORÇAMENTO E GESTÃO, 2007).

Na América Latina e no Caribe estima-se que morrem anualmente entre 12 a 28 mil crianças, por doença causadas por *Streptococcus pneumoniae*; em outras palavras, 2 a 3 crianças morrem a cada hora por causa de complicações causadas por essa bactéria (VALENZUELA & FLANNERY, 2006; VALENZUELA et al., 2009).

Nas últimas décadas no Brasil, as taxas de mortalidade infantil, apesar de ainda elevadas, têm apresentado redução importantes (AHMAD et al., 2000). Das estratégias de atenção à saúde da criança (MS, 1984), as reduções observadas decorreram de intervenções nos serviços de saúde, mas, principalmente, foram resultantes do controle das doenças diarreicas a partir da ampla divulgação dos conhecimentos sobre a terapia de reidratação oral (TRO), implantada para evitar a desidratação e morte associada à diarreia. Tal ação permitiu uma diminuição considerável no número de óbitos por essa causa (BENGUIGUI, 2002). Como resultado, as IRA, que, no princípio dos anos 1980, ocasionavam menos mortes que as doenças diarreicas, passaram a ocupar o primeiro lugar como causa de mortalidade por doenças infecciosas na população infantil (BENGUIGUI, 2002).

Em Rondônia no município de Cacoal, (ALBUQUERQUE, 2006) em um estudo com crianças de 0 a 12 anos com problemas respiratórios que deram entrada no Hospital Municipal materno infantil nos anos de 2002 a 2004 concluiu-se que a

prevalência das internações com IRA foi maior no período seco com 62,3% e uma prevalência de 36,8% no período chuvoso. Os resultados mostraram também que as crianças mais atingidas pela IRA foram as menores de 3 anos que alcançaram índices de 75,1%, entre todos os casos estudados.

No município de Porto Velho, Rondônia (BARROS et al., 2010) em um estudo transversal, compreendendo crianças de 29 dias a 12 anos de idade, com doenças respiratória, foi demonstrado que nos períodos de janeiro de 2007 a dezembro de 2010 foram registrados no Hospital Infantil Cosme e Damião-HICD 13.855 e na Unidade de Terapia Intensiva Pediátrica-UTIP, do Hospital de Base Dr. Ary Pinheiro-HBAP 1.156 internações hospitalares. Deste quantitativo, 5.137 (37%) e 254 (22%) foram para doenças do aparelho respiratório respectivamente. Nesse mesmo estudo analisados os dados da faixa etária em menores de 12 anos para o período estudado, o Hospital Infantil Cosme e Damião-HICD demonstrou que 84% de DR ocorreram em menores de 5 anos com 3.639 casos, seguido das crianças de 5 a 9 anos com 539 internações (13%), e 10 a 12 anos com 128 (3%) internações. Na Unidade de Terapia Intensiva Pediátrica-UTIP, as crianças menores de 5 anos também evidenciaram o maior número de internações, com proporção de 69%, o equivalente a 81 registros. As crianças de 5 a 9 anos corresponderam 26 internações (22%) e as crianças de 10 a 12 anos com 9% internações. Os resultados demonstram que as doenças do aparelho respiratório para o município de Porto Velho, representaram a primeira causa de internações no Hospital Infantil Cosme e Damião-HICD e na Unidade de Terapia Intensiva Pediátrica-UTIP quando comparadas as demais doenças para os anos 2007 a 2010.

1.2 ASPECTOS GERAIS DO *Streptococcus pneumoniae*

S. pneumoniae, também chamado de pneumococo faz parte da microbiota do trato respiratório superior de uma parcela de indivíduos, podendo colonizar a nasofaringe de seres humanos desde o primeiro dia de vida (AUSTRIAN, 1986). Na maioria das vezes os pneumococos colonizam a superfície mucosa conferindo aos indivíduos apenas a condição de portador sadio. Entretanto, na presença de fatores

predisponentes do hospedeiro, eles podem invadir sítios estéreis adjacentes ou a corrente sanguínea e causar infecção localizada ou sistêmica (AUSTRIAN, 1986; BOGAERT et al., 2004), contribuindo com as infecções respiratórias aguda.

1.3 HISTÓRIA DA DESCOBERTA DO *Streptococcus pneumoniae*

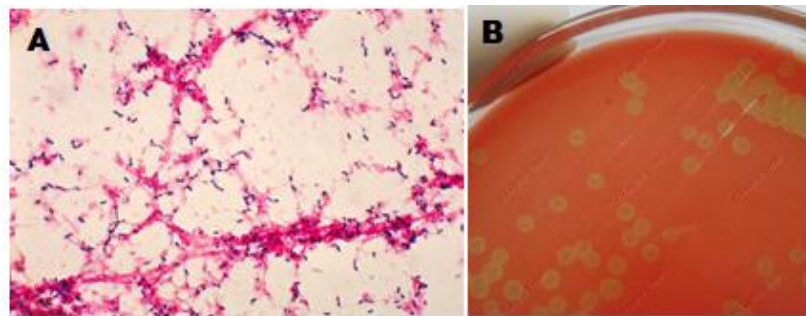
S. pneumoniae, foi primeiramente visualizado em tecidos pulmonares, em 1875, por Klebs, posteriormente por Ebert, em 1880 e por Koch em 1881. Paralelamente, seu isolamento foi reportado por Stemberg, nos Estados Unidos da América (EUA), e por Louis Pasteur, na França. Os experimentos evidenciavam a presença do pneumococo em faringe de indivíduos sãos, sem correlacionar com doença (AUSTRIAN, 1981). A correlação com doença aconteceu quando os mesmos pesquisadores inocularam a bactéria isolada em coelhos. Posteriormente, em 1882, a associação com pneumonia foi descrita por Friedlander, e em 1886, por Weichselbaum, e em um período de 10 anos este agente já estava associado como agente causal de endocardites, meningites purulentas, otites, artrites, sinusites e conjuntivites (AUSTRIAN, 1981). Christian Gram contribuiu para realização da sua identificação por meio da coloração de Gram, enquanto Neufeld, em 1900, descreveu a sua característica microbiológica de ser solúvel em bile, o que é utilizada até hoje para diferenciá-lo dos demais estreptococos. Em 1902, Neufeld descreveu a reação de Quellung, reação de antígeno e anticorpo entre cápsulas bacterianas e antissoros homólogos, atualmente sendo a técnica padrão para identificação dos sorotipos dos pneumococos (AUSTRIAN, 1981).

1.4 CARACTERIZAÇÃO MORFOLÓGICA DO *Streptococcus pneumoniae*

S. pneumoniae, pertence ao Reino Monera; Filo Firmicutes; Classe Bacilli; Ordem Lactobacillales; Família Streptococcaceae; Gênero *Streptococcus* (BERGEY, 2001). É uma bactéria anaeróbia facultativa, capsulada, que se apresenta na

coloração de Gram como cocos Gram positivos, com diâmetro que varia entre 0,5 e 1,2 μm , lanceolados e quase sempre dispostos aos pares (Figura A1). Como característica das bactérias que compõem o seu gênero, o pneumococo não produz catalase e quando cultivado em ágar suplementado com sangue produz α -hemólise, a qual é evidenciada pelo esverdeamento do ágar sangue (Figura B1) e exige uma atmosfera enriquecida com 5% de CO_2 para um bom crescimento em cultura (KONEMAN, 2008).

Figura 1 - Coloração de Gram e características macroscópicas de colônia de pneumococo em cultivo em Agar sangue.



A – Coloração de Gram demonstrando característica morfotintorial do *S. pneumoniae* em amostra. B – α -hemólise em meio Agar sangue. Colônias de *S. pneumoniae* (Colônias pequenas, planas, bordas irregulares, achatadas e brilhosas).

Fonte: <http://textbookofbacteriology.net/S.pneumoniae.html>
<http://microdidatia.wordpress.com/microbiologa-geral/aspectos-culturais>

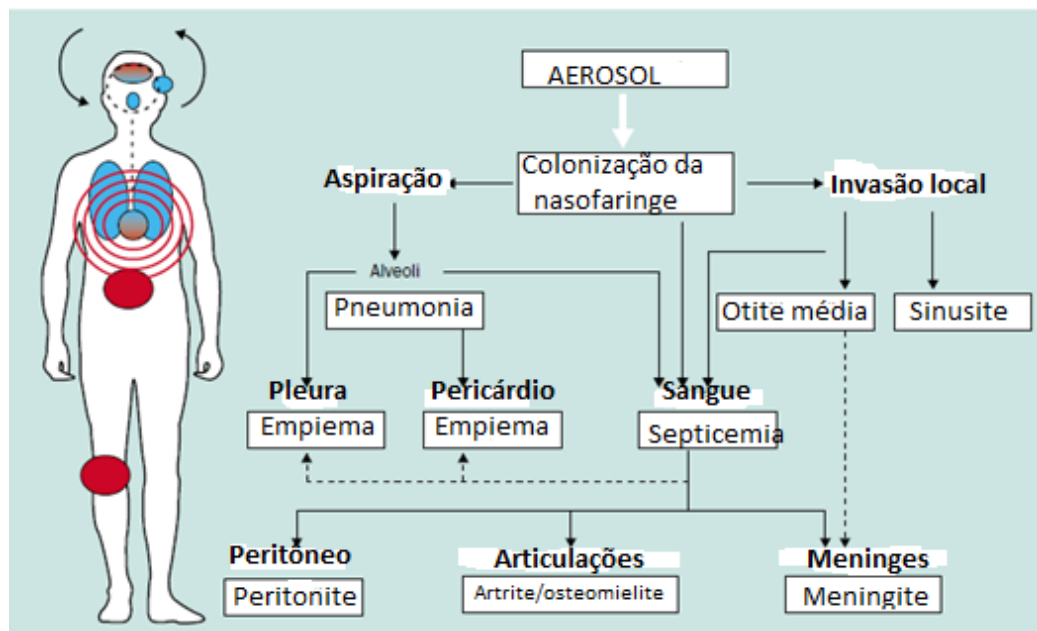
1.5 COLONIZAÇÃO POR *S. pneumoniae*

A nasofaringe é o principal reservatório do pneumococo, iniciando a colonização logo após o nascimento, não constando relatos de colonização intraparto por *S. pneumoniae* (FAUST et al., 2012).

Através de gotículas suspensas no ar que contém a bactéria, ocorre a transmissão do pneumococo que entram em contato com o hospedeiro através da via respiratória podendo ocorrer a colonização (KADIOGLU et al., 2008).

Esta bactéria faz parte da microbiota normal do trato respiratório superior de humanos, sendo que a prevalência na nasofaringe de indivíduos saudáveis, varia principalmente em função da idade, sendo mais prevalente em crianças do que adultos; tendo início logo após o nascimento e alta prevalência entre um e dois anos de idade, seguido de redução até alcançar taxas inferiores a 10% nos adultos (GRAY et al., 1980; HUSSAIN et al., 2005; FRANCIS et al., 2009; DONKOR, 2013).

Figura 2 - Rota da infecção causada por *S. pneumoniae*



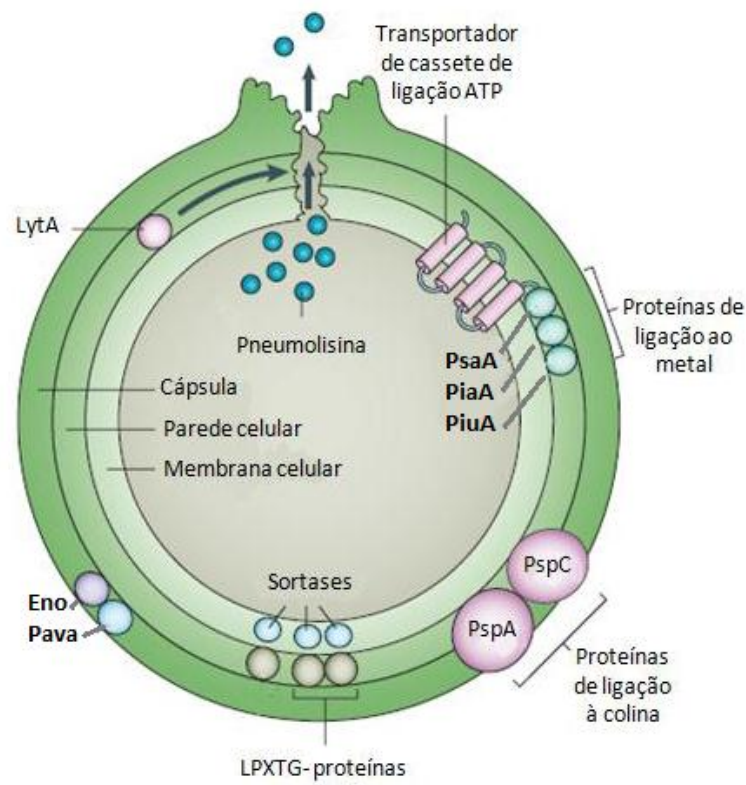
Rota da infecção causada por *S. pneumoniae*. Redesenhado de OBARO, 2002. Órgãos infectados através das rotas do ar e do sangue, sendo retratados em azul e vermelho, respectivamente. Fonte: (Adaptada de BOGAERT et al., 2004)

A flora microbiana da nasofaringe é complexa incluindo microorganismos não patogênicos (*Streptococcus spp.*, *Prevotella spp.* e outras bactérias aeróbias e anaeróbias) e outros potencialmente patogênicos (*S. pneumoniae*, *Haemophilus influenzae*, *Moraxella catarrhalis*, *Neisseria meningitidis*) (SCHRAG et al., 2000; ZEMLICKOVA, 2006). O único reservatório natural do pneumococo é a nasofaringe, onde ele subsiste e através do qual se propaga para outros hospedeiros ou para outros nichos no mesmo hospedeiro, embora a colonização com pneumococos principalmente assintomática, que pode evoluir para respiratório ou mesmo doença sistêmica (Figura 2).

1.6 FATORES DE VIRULÊNCIA E MECANISMO DE PATOGENICIDADE

Os fatores de virulência encontrados no pneumococo são diversos, incluindo cápsula polissacarídica, parede celular, proteínas ligadoras de colina (CBPs), proteínas de superfície do pneumococo A e C (PspA e PspC), neuraminidase ancoradas à proteína (LPXTG), hialuronidase (Hyl), enolase (Eno), pneumolisina, autolisina A (Lyt A), as proteínas transportadoras de metais (Psa A), proteínas aquisitoras de ferro A (Pia A) e proteínas exportadoras de ferro (Piu A), Figura 3 (KADIOGLU et al., 2008).

Figura 3 - Fatores de virulência pneumocócica



Fatores de virulência pneumocócicas incluem: a cápsula; parede da célula; proteínas de ligação a colina; proteínas de superfície de pneumococo A e C (PspA e PspC); as proteínas neuraminidase LPXTG ancoradas; hialuronidase (Hyl); adesão pneumocócica e virulência A (Pava); enolase (Eno); pneumolisina; A autolisina (LytA); e as proteínas de ligação a metais superfície pneumocócica antígeno A (PsaA), pneumocócica aquisição de ferro A (PiaA) e captação de ferro pneumocócica A (PiuA). Fonte: (Adaptada de KADIOGLU et al., 2008).

1.6.1 Cápsula polissacarídica

Um importante fator de virulência é a capsula polissacarídica, pois o pneumococo possui alelos gênicos com capacidade de inibir enzimas de mais de 90 sorotipos diferentes com diferentes propriedades antifagocitárias. Essa cápsula funciona como uma barreira protetora, impedindo a ativação da via alternativa do complemento, na interação entre molécula de C3b e superfície bacteriana, impedindo as células fagocíticas de englobar a bactéria, sendo ainda determinante na colonização, invasão e disseminação no trato respiratório, podendo também dificultar a ativação da cascata clássica do sistema complemento, havendo o impedimento da ligação de antígenos de superfície a IgM (RUBINS; JANOFF, 1997; LÓPEZ, 2004; POLL; OPAL, 2009; PEPPOLONI et al., 2010).

De acordo com estudo de Mantese et al., (2009) os sorotipos capsulares mais encontrados em países em desenvolvimento foram 14, 6A/6B, 5, 1, 19F/19A, 9N/9V e 23F, tendo como maior prevalência os sorotipos 5 e 1 na América Latina.

1.6.2 Pneumolisina

A pneumolisina é uma toxina formadora de poros encontrada em todos os sorotipos de pneumococo, sendo considerada um fator chave no potencial de virulência. É liberada pelo microrganismo ao sofrer autólise espontânea, possuindo como mecanismo de ação a interação com o colesterol (PATON, 1996; RUBINS; JANOFF, 1998).

A α -hemólise observada em meios de cultivo enriquecidos com sangue se deve ao fato da pneumolisina atacar e destruir a membrana dos glóbulos vermelhos (PRADO, 2001).

Diferentes de outros antígenos pneumocócicos, a pneumolisina é uma enzima citoplasmática que é liberada devido à ação de superfície da autolisina. Portanto, a pneumolisina é diretamente dependente da ação da autolisina (JEDRZEJAS, 2001).

A L-alanina N-acetilmuramoyl-amidase, também conhecida como lytA amidase, é um exemplo de autolisina, sendo uma enzima de constante estudo

devido a reconhecida participação na patogênese do pneumococo. A *lytA* promove de forma indireta o aumento da virulência do pneumococo, pois devido a sua presença proteínas citoplasmáticas bacterianas, como a pneumolisina são liberadas. Por ser uma proteína citoplasmática liberada após a autólise da célula bacteriana, contribui para a patogênese da doença invasiva (PRADO, 2001).

1.6.3 Hialuronidase

É uma proteína produzida pela maioria dos *S. pneumoniae*, estando diretamente envolvida na invasão do hospedeiro, possuindo capacidade de quebrar o ácido hialurônico presente nos tecidos conjuntivos. Esse fator aumenta a permeabilidade, gerada pela lesão da matriz extracelular, provocando um ferimento, facilitando sua disseminação e infecção (JEDRZEJAS, 2001; HIRST et al., 2004; PRITCHARD et al., 2004).

1.6.4 Neuramidases

A maioria das cepas de pneumococo produzem as enzimas neuramidases. Entre elas a neuramidase A (NanA), sendo uma enzima com capacidade de clivar o ácido siálico, que estão armazenados em glicoproteínas, glicolipídios e oligossacarídeos encontrados na superfície celular, expondo os receptores das células hospedeiras, promovendo dessa forma a colonização (PRADO, 2001; NORMARK; NORMARK, 2010).

1.7 Mecanismo de colonização

A nasofaringe humana é o principal sítio de aquisição de bactérias patogênicas do trato respiratório e a maioria dos indivíduos mantém uma relação

comensal, estabelecendo um estado de colonização assintomática (AUSTRIAN, 1986). Entretanto o significado do estado de portador ainda não está totalmente elucidado. A colonização do Trato Respiratório Superior (TRS) pode ser o primeiro passo para a ocorrência de doença local ou sistêmica. Diversos estudos vêm confirmando a relação entre colonização nasofaríngea pelo *S. pneumoniae* e risco de desenvolver infecção do trato respiratório (especialmente otite média aguda (ZENNI et al., 1995) e doença invasiva (LLOYD-EVANS et al., 1996).

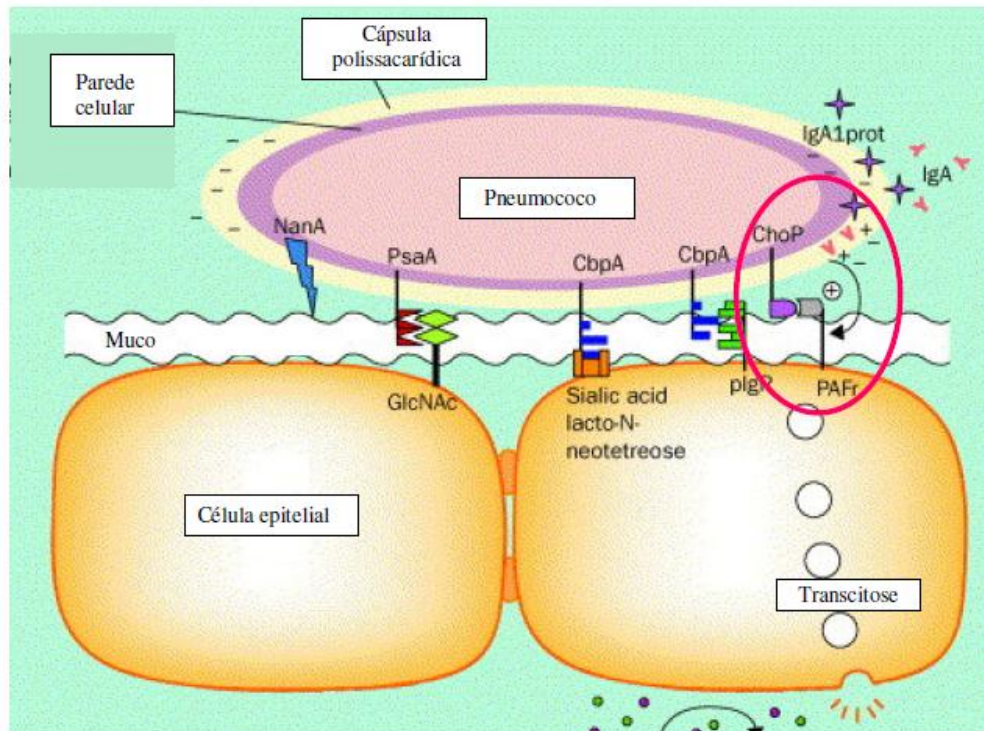
Apesar de uma grande maioria de pessoas serem colonizadas pelos pneumococos, isso pode ou não resultar em doença. O sucesso desta colonização depende tanto da virulência do sorotipo bem como da eficiência do sistema imune do hospedeiro, podendo a bactéria se espalhar para a mucosa adjacente e causar doença invasiva (BOGAERT et al., 2004; WOODS, 2008).

Para que a aderência dos pneumococos às células epiteliais humanas ocorra, há uma interação com no mínimo 4 carboidratos diferentes, e a capacidade dos isolados em reconhecer estes carboidratos podem estar relacionados a variação em sua capacidade invasiva (Figura 4) (NOVAK et al., 1999).

De acordo com Bogaert e colaboradores (2004), a prevalência de um determinado sorotipo é influenciada, em parte, pelo grau de expressão e conformação de suas adesinas de superfície, que permitiriam à bactéria reconhecer e aderir às células da mucosa epitelial, como por exemplo a colina, constituinte da parede celular e membrana plasmática, que apresenta elevada afinidade pelo receptor do fator ativador de plaquetas (PAFr) presente nas células epiteliais, e a ligação entre estes dois componentes promove a migração dos pneumococos através do epitélio respiratório e endotélio vascular (Figura 4).

Pode também contribuir para aumentar a frequência de colonização fatores do hospedeiro como: grupo étnico, aglomeração, uso de cigarro e antibióticos e fatores socioeconômicos, como renda e número de irmãos (GHAFFA et al., 1999; LEIBERMAN et al., 1999).

Figura 4 - Interação entre *S. pneumoniae* e células epiteliais humanas



A neuraminidase (NanA), diminui a viscosidade do muco e expõe o N-acetil-glicosamina (GlcNAc) e receptores das células epiteliais, que podem interagir com as proteínas associadas à superfície de pneumococos, tais como PsaA. A ligação entre a colina (ChoP) e o receptor do fator ativador de plaquetas (PAFr) promove a transcitose da bactéria através do epitélio, culminando com a invasão de sítios estéreis e estimulação da produção de citocinas, como IL-1 e TNF α . A IgA1 pneumocócica cliva a protease opsonina IgA, o que resulta em uma mudança (neutralização) de carga de superfície e aumenta a proximidade física entre o pneumococo e a parede celular para o receptor fator de ativação de plaquetas. Fonte: (Adaptada de BOGAERT *et al.*, 2004)

De acordo com Tuomanen, 1997, a conversão da colonização assintomática para doença invasiva requer a produção local de mediadores inflamatórios como interleucina 1 e TNF, como observado durante infecções virais. Outros fatores que aumentam o risco de desenvolvimento de infecções pneumocócicas são a má nutrição, fumo, asplenia, cirrose e deficiências congênitas envolvendo imunoglobulinas ou componentes do sistema complemento e AIDS (PLOTKOWSKI *et al.*, 1986; HAKANSSON *et al.*, 1994; CUNDELL *et al.*, 1995 e BOGAERT *et al.*, 2004). Na presença de um ou mais dessas condições, os pneumococos ganham acesso ao pulmão por aspiração, onde aderem a células alveolares (TUOMANEN *et al.*, 1995).

Conforme estudos de AUTRIAN, 1984; BERGERON *et al.*, 1998, a progressão para pneumonia se dá pela fagocitose ineficiente, que leva à

multiplicação do patógeno nos alvéolos e liberação de citocinas no fluido bronqueoalveolar, seguido de um processo inflamatório intenso mediado por componentes da parede celular da bactéria, com recrutamento de macrófagos e neutrófilos e liberação de óxido nítrico, causando danos ao tecido pulmonar. Se a multiplicação bacteriana persiste, a resposta inflamatória exacerbada provoca a formação de edema e acúmulo de fibrina, podendo levar o paciente à morte (NOVAK et al., 1999).

1.8 PREVALÊNCIA DE PORTADOR DE *Streptococcus pneumoniae* E SOROTIPOS

De acordo com estudos de Saukkoriipi e colaboradores (2004); Billal e colaboradores (2008); Antonio e colaboradores (2009); Brugger e colaboradores (2009); Da Gloria e colaboradores (2010); Bouskraoui e colaboradores (2011); Abdullahi e colaboradores (2012); Adetifa e colaboradores (2012); Chien e colaboradores (2012); Korona-Glowniak & Malm (2012); Regev-Yochay e colaboradores (2012); Wroe e colaboradores (2012), em crianças saudáveis menores de cinco anos, a prevalência de portador (Tabela 1) varia entre as regiões geográficas, exibindo diferenças significativas na dependência de vários fatores e os sorotipos mais frequentemente detectados na nasofaringe são 3, 6A, 6B, 14, 15B, 15C, 18, 19F, 23F.

A prevalência de portador de pneumococo em crianças que frequentam creches varia de 29% a 90% e os sorotipos mais frequentemente isolados são o 6A, 6B, 14, 15, 19A, 19F e 23F (HILL et al., 2006; SA-LEAO et al. 2006; ZEMLICKOVA et al., 2006; RODRIGUES et al., 2009; SA-LEAO et al., 2009; GRIVEA et al. 2011; BAE et al., 2012; ERCIBENGOA et al., 2012; KORONA-GLOWNIK & MALM 2012; VALENTE et al., 2012).

Tabela 1 - Taxa de prevalência de *Streptococcus pneumoniae*

País	%
Estados Unidos	29
Polônia	44
Marrocos	46
Faixa de Gaza	50
Suíça	52
Nigéria	53
Japão	60
Quênia	66
Gâmbia	66
Finlândia	69
Israel	69
Peru	77

No Brasil, a prevalência de portador de *S. pneumoniae* varia de 13% a 72%, estando relacionada com idade e presença de doenças associadas (FERREIRA et al., 2001; REY et al., 2002; LUCAREVSCHI et al., 2003). Os sorotipos mais comuns detectados foram 6A, 6B, 14, 15, 19A, 19F, 23F, mas a maioria desses estudos foram realizados com crianças que frequentavam creche (WOLF et al., 2000; LUCAREVSCHI et al., 2003; REIS et al., 2008; FRANCO et al., 2010; LAMARO-CARDOSO et al., 2012).

As taxas de cocolonização (quando mais de uma estirpe de pneumococo coloniza a nasofaringe ao mesmo tempo) têm variado de 3,5 a 30% de acordo com diferentes estudos. Esse fator representa uma oportunidade para a transferência horizontal do gene, o principal mecanismo da evolução do pneumococo (GRATTEN et al., 1994; SPRATT et al., 2001; BOGAERT et al., 2004; MORENO et al., 2005; BRUGGER et al., 2009; RIVERA-OLIVERO et al., 2009).

1.9 *Streptococcus pneumoniae* E A SUSCEPTIBILIDADE AOS ANTIMICROBIANOS

O aumento da resistência à penicilina pelo *S. pneumoniae* nos últimos 40 anos tem sido reportado em muitas regiões do mundo ameaçando os avanços alcançados durante o período pós-antimicrobiano (TOMASZ, 1997; HEFRON, 1979; BREIMAN et al., 1990; APPELBAUM, 1992).

Segundo KLUNGMAN (2002), esse aumento da resistência pneumocócica se deve principalmente à dispersão de clones multirresistentes do patógeno. A resistência à penicilina e a outros antibióticos β -lactâmicos está associada com modificações nos genes que codificam proteínas ligadoras de penicilina e enzimas envolvidas na síntese de peptidoglicano, que são moléculas alvo para os β -lactâmicos (BERGMANN et al., 2004). Acredita-se que a aquisição destes determinantes de resistência por alguns clones ocorra por pressão seletiva devido ao consumo indiscriminado e extensivo de antibióticos (SADOWY et al., 2006).

Estudos conduzidos na Itália, demonstraram que a taxa de resistência aos macrolídeos (30 a 40%) é uma das mais elevadas da região quando comparado com os países do sul europeu, havendo uma discrepância entre a taxa de resistência à penicilina, a qual é moderada, cerca de 10 a 12% (MARCHESE et al., 2005; MONACO et al., 2005).

Estudos realizados no Brasil, tem demonstrado que a resistência à penicilina emergiu rapidamente desde o surgimento do primeiro caso reportado em 1988 (DE SOUZA MARQUES et al., 1988).

De acordo com estudos de TEIXEIRA et al., (1997); KERTESZ et al., (1998); BRANDILEONE et al., (2006) entre os anos de 1993 a 2004, a frequência de pneumococo não susceptível a penicilina (PNSP) aumentou de 10,2 para 27,8%. Um significativo aumento foi observado em 1999 tanto para o nível intermediário (12,4 a 22,0%) como para resistente (2,4 para 5,9%).

1.10 PRINCIPAIS MECANISMOS DE RESISTÊNCIA

a) Resistência à penicilina e a β lactâmicos: ocorre por mutações nas proteínas ligadoras de penicilina (PBPs), resultando na diminuição da afinidade da penicilina às PBPs, ou seja, ocorre redução na capacidade das moléculas do antimicrobiano se ligarem aos PBPs: 1A, 1B, 2A, 2B e 2X (HACKENBECK et al., 1986). Contudo outros antibióticos como Ceftriaxona, Cefotaxima e Carbapenem são poucos afetados (SMITH & KLUGMAN, 1998).

b) Resistência à macrolídeos: Os macrolídeos agem bloqueando a síntese protéica. O mecanismo de resistência ocorre por uma modificação no sítio ativo mediado pela enzima *ermB*-metilase, que confere resistência à todos macrolídeos, lincosamidas e estreptogamina B. Outro mecanismo de resistência é devido ao efluxo da bomba, codificado pelos genes *mef* (*mef A* e *mef E*). Este mecanismo de resistência não abrange a lincosamidas e estreptogaminas (FELMINGHAM et al., 2007).

c) Resistência à quinolonas (fluoroquinolonas): é devido a uma mutação de ponto, produzindo alterações na região da subunidade DNA topoisomerase IV (*ParC*₂*GyrB*₂) e DNA girase (*GyrA*₂*GyrB*₂) (STANPHONE et al., 2005). Contudo a resistência pode também ser adquirida por recombinação intra-específica ou interespecífica com *Streptococcus* do grupo *mitis* (FERRANDIZ et al., 2000).

1.11 A FORMAÇÃO DO BIOFILME EM *S. pneumoniae*

Vários autores têm recentemente detectado biofilmes pneumocócicas na superfície da adenoide e tecidos epiteliais da mucosa em crianças com infecções do ouvido médio recorrente e otite média com efusão (HALL-STOODLEY et al., 2006; COATES et al., 2008.; HOA et al., 2009; NISTICO et al., 2011), bem como sobre a mucosa sinusal de pacientes com rinosinusite crônica (SANDERSON et al., 2006). O significado clínico da formação do biofilme ainda é desconhecido, mas sugere-se que ele auxilia no crescimento do patógenos durante a colonização e

contribui para o desenvolvimento de doenças invasivas (SANCHEZ et al., 2011; SIMELL et al., 2012, CHAO et al., 2015).

Estruturas de biofilme semelhante foram detectados nos pulmões de camundongos infectados com *S. pneumoniae* sendo semelhantes aos produzidos em um biofilme de modelo de fluxo contínuo (SANCHEZ et al., 2011).

O primeiro sistema projetado para biofilmes pneumocócicos, descrito em 1997 e desenvolvido como um meio de avaliar a susceptibilidade a antibióticos, baseou-se no crescimento de estado estacionário em filtros Sabouraud celulose (BUDHANI & STRUTHERS, 1997). Posteriormente, foi mostrado que o crescimento pneumocócico nestes filtros em um sistema de cultura contínuo tipo assemelha a nasofaringe do agente patogênico (WAITE et al., 2001). Outros grupos de pesquisa desenvolveram sistemas de reatores de biofilme para analisar biofilmes pneumocócicas e estudar os processos de biofilme *in situ* e em tempo real (DONLAN et al., 2004; GOERES et al., 2005). Usando um contínuo fluxo de cultura de células de um meio ágar de tripticase de soja (TSA II) suplementado com 5% de sangue de carneiro a 37 °C em 5% de CO₂, Allegrucci e colegas (2006) demonstrou que *S. pneumoniae* adota vários fenótipos ao longo do desenvolvimento do biofilme.

Moscoso e colaboradores (2006) analisou a capacidade de *S. pneumoniae* para formar biofilmes em superfícies abióticas, testando uma variedade de materiais, incluindo vidro, cloreto de polivinilo e poliestireno bem como os fatores que afetam a formação de biofilme como pH, osmolaridade e enriquecimento dos meios com extrato de levedura e albumina de soro bovino. Concluiu que a formação de biofilme é mais forte no poliestireno e pH entre 7,0 e 8,0 e osmolaridade inferior a 0,2 M, não constatando diferença significativa quanto ao enriquecimento do meio.

O ácido siálico (a uma concentração equivalente à do ácido siálico livre na saliva humana) aumenta a formação de biofilme pneumocócico *in vitro*, e uma relação causal foi estabelecida entre o ácido siálico livre e colonização da nasofaringe e se espalhou para os pulmões em ratinhos (TRAPPETTI et al., 2009).

Recentemente foi relatado que a formação de biofilme por pneumococos é favorecida em atmosfera enriquecida com CO₂ (CAMILLI et al., 2011).

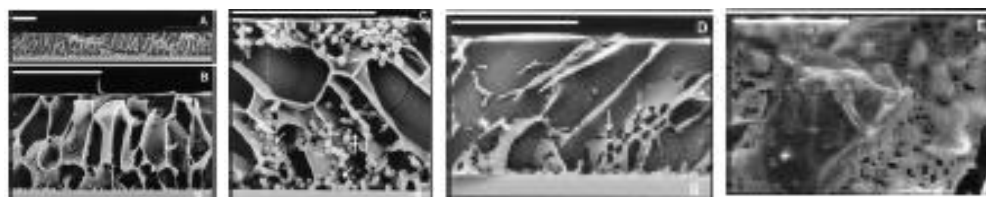
Os biofilmes formados por uma cepa de pneumococo não-encapsulado em superfícies abióticas foram encontrados possuindo uma organização tridimensional com estruturas complexas cerca de 25-30 µm de espessura, como revelado por

microscopia confocal a laser (CLSM) (MOSCOSO et al., 2006). A distribuição espacial das bactérias aderentes foi posteriormente examinada por Microscopia Confocal a Laser (MCVL) usando uma cepa não-encapsulado *S. pneumoniae* que sintetiza a proteína fluorescente verde, ou por coloração das bactérias com corantes fluorescentes, após a formação de biofilmes em pratos de vidro incubados por 10-12 horas de incubação a 34 °C (MOSCOSO et al., 2006; DOMENECH et al., 2009). Estes estudos detectaram a presença de pequenos vazios e canais que separam as micro-colônias dentro do biofilme pneumocócico. Usando um sistema de reator de biofilme de fluxo contínuo, Allegrucci e colegas (2006) relataram que a arquitetura de biofilmes maduros (aqueles cultivados a 37° C em 5% de CO₂ durante 6-9 dias) diferiu significativamente entre os sorotipos testados.

As estruturas de favo de mel (Figura 5) como observadas por microscopia eletrônica de varredura de baixa temperatura (MOSCOSO et al., 2006), pode proporcionar estabilidade mecânica para biofilmes pneumocócicos servindo como um importante fator de virulência, ajudando a afastar as defesas do hospedeiro, como descrito para outras comunidades microbianas (MOSCOSO et al., 2006; SCHAUDINN et al., 2007).

Dentro de um biofilme, as células bacterianas são incorporadas numa matriz extracelular composta de diferentes substâncias poliméricas extracelulares (EPS), incluindo exopolissacarídeos, proteínas, ácidos nucleicos e lipídios. EPS muitas vezes determinam o cadafalso para a arquitetura tridimensional do biofilme e fornece a integridade e a coesão estrutural, contribuindo também para a resistência antimicrobiana e as defesas do hospedeiro mediadas pelo biofilme, permitindo a acumulação de nutrientes do meio ambiente e do lançamento do material celular pós-morte. A presença de DNA extracelular na matriz pode facilitar a Transferência Horizontal de Genes (HGT) entre as células do biofilme (FLEMMING & WINGENDER, 2010).

Figura 5 - Microscopia eletrônica de varredura de baixa temperatura-LTSEM



(A) Vista geral da formação de biofilme na superfície de uma lâmina de vidro. (B) Ampliação da área indicada por um retângulo no painel A. (C e D) Dois diferentes pontos de vista. Materiais filamentosos (indicados por setas) liga as células de pneumococos para o outro e para a matriz intercelular. (E) Apical da superfície irregular de um biofilme pneumocócico. Micro-colônias de tamanho diferentes podem ser vista. Em todas as micrografias, a barra indica 20μm. Fonte: (Adaptada de MOSCOSO *et al.*, 2006).

A importância da formação de biofilmes do ponto de vista médico, reside na susceptibilidade reduzida das bactérias participantes aos agentes antimicrobianos (LEWIS, 2008) e sua capacidade de iludir os sistemas de defesa imune do hospedeiro (JENSEN *et al.*, 2010). Uma alta porcentagem de pacientes com infecções crônicas e persistentes tem sido associado a formação de biofilmes que agem como reservatórios de patógenos (WOLCOTT & EHRLICH, 2008).

1.12 VACINAS PNEUMOCÓCICAS

O desenvolvimento de vacinas, foram estimuladas pelo elevado índice de mortalidade por infecções pneumocócicas e a emergência de cepas resistentes aos principais antimicrobianos (BRINKS e BEREZIN, 2006).

De acordo com Pletz e colaboradores (2008) existem dois tipos de vacinas pneumocócicas: as polissacarídica e as conjugadas e ambas possuem em sua formulação polissacarídeos capsulares como antígenos que estimulam a produção de anticorpos sorotipo-específico.

A vacina polissacarídica 23-valente (PPV-23, Pneumovax23, *Merck & Company Inc.*) foi licenciada nos Estado Unidos da América desde 1983 e é composta por polissacarídeos purificados de 23 sorotipos (1, 2, 3, 4, 5, 6B, 7F, 8, 9N, 9V, 10A, 11A, 12F, 14, 15B, 17F, 18C, 19F, 19A, 20, 22F, 23F e 33F) (PLETZ *et al.*, 2008).

Estudos de Vlasic (2001); Hausdorf e colaboradores (2005); CDC (2008), mostram que o uso da vacina PPV-23 é bastante limitado porque ela estimula uma resposta imunológica T independente, não sendo, portanto indicada para crianças menores de dois anos de idade, que possui o sistema imunológico imaturo, sendo esta vacina efetiva na prevenção de doenças invasivas, principalmente, em idosos maiores de 65 anos, na redução de hospitalizações por infecções pneumocócicas, na prevenção de bacteremia e, sobretudo nas mortes hospitalares.

No Brasil, o Programa Nacional de Imunizações (PNI) foi criado em 1973 e regulamentado no ano de 1975 pela Lei nº 6.259/75 por meio do Decreto nº 78.231/76, representando um instrumento destinado à proteção da população brasileira contra doenças que podem ser evitadas com o uso de imunobiológicos, incluindo as vacinas (MS/PNI, 2012).

A vacina pneumocócica 23-valente foi incorporada pelo PNI, no Brasil no ano de 1992, para a prevenção da doença pneumocócica para grupos com quadros clínicos específicos (OSELKA, 2003).

A heptavalente (PCV-7) foi a primeira vacina conjugada sendo licenciada nos Estados Unidos em 2000 e formulados com antígenos dos sete sorotipos mais prevalentes em doenças invasivas pediátrica naquele país, os sorotipos 14, 6B, 19F, 18C, 23F 4, 9V e através de estudos clínicos a eficácia da vacina foi comprovada em 94% das crianças vacinadas contra doenças invasivas causadas pelos sorotipos representados na vacina (CDC, 2005).

A PCV-10 (*Synflorix*, GSK) possui 3 sorotipos (1, 5, 7F) a mais que a vacina PCV-7, além de diferir nas proteínas utilizadas para a conjugação, a PCV-10 possui 8 dos 10 polissacarídeos conjugados a uma proteína de membrana externa (proteínas D) da bactéria *Haemophilus influenzae*, e os outros dois polissacarídeos (sorotipos 18C e 19F) são conjugados a um toxóide tetânico e um toxóide diftérico modificado, respectivamente (WHITNEY et al., 2003). No Brasil a introdução da vacina pneumocócica decavalente (PCV-10) foi introduzida no primeiro semestre de 2010 no PNI (MINISTÉRIO DA SAÚDE, 2010).

O Brasil foi o primeiro país a introduzir a PCV-10 no PNI, de forma progressiva nos diferentes municípios, a partir de março de 2010. A vacina foi licenciada para a vacinação primária e de reforço em crianças até dois anos de idade e rotineiramente utilizada no esquema de três doses, aos dois, quatro, e seis

meses de idade ou duas doses de sete a onze meses de idade, e uma dose de reforço dos 12 aos 18 meses. De acordo com o PNI, a cobertura da PCV-10 estimada em Goiânia durante o período do estudo foi de aproximadamente 90% para a primeira dose (MINISTÉRIO DA SAÚDE, 2011).

Em recente estudo da avaliação da PCV10 no impacto nas taxas de hospitalizações por doenças respiratórias e pneumonia, realizado no Brasil, identificou-se redução efetiva da doença entre crianças, após a introdução da vacina (AFONSO et al., 2013).

Dados atualizados da OMS mostraram que até o ano de 2012, 86 países em todo o mundo já haviam introduzido a vacina pneumocócica conjugada no calendário básico vacinal da criança (WHO, 2013).

2 JUSTIFICATIVA

Ainda são escassos os estudos sobre a prevalência das doenças respiratórias agudas em crianças na região norte, onde está localizado o Estado de Rondônia.

Essas infecções são responsáveis por altas taxas de morbidade e mortalidade infantil, principalmente em países em desenvolvimento podendo ter causas virais ou bacterianas.

A colonização bacteriana desempenha um papel importante dessas patogenias, entretanto há uma baixa especificidade do diagnóstico dos agentes etiológicos que causam tais infecções. Diante desse quadro é que procuramos analisar um dos agentes bacterianos causador de IRA, o *Streptococcus pneumoniae*, a fim de caracterizar, avaliar a sensibilidade frente aos antibióticos e investigar os sorogrupos circulante.

3 OBJETIVOS

3.1 OBJETIVO GERAL

Determinar a colonização da nasofaringe de cepas de *S. pneumoniae* em crianças com infecções respiratórias agudas na região de Porto Velho-RO.

3.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS

- ✓ Avaliar a sensibilidade das cepas de *S. pneumoniae* aos antibióticos da classe das: Penicilina, Glicopeptídeos, Macrolídeos, Tetraciclina, Inibidores de folato, Fenicolis, Ansamicinas e Lincosaminas;
- ✓ Investigar os sorogrupos e sorotipos circulantes pela tipagem molecular.
- ✓ Analisar quantitativamente a capacidade de formação de biofilme “*in vitro*” das cepas identificadas de *S. pneumoniae*.

4 METODOLOGIA

4.1 LOCAL DO ESTUDO E POPULAÇÃO ESTUDADA

O estudo foi realizado no Centro de Pesquisa e Medicina Tropical-CEPEM, com as amostras obtidas de secreções da nasofaringe de 660 crianças de 0 a 6 anos de idade, admitidas no HICD, com quadro clínico de IRA, no período compreendido entre os meses fevereiro a dezembro de 2013. As coletas ocorreram em dois dias da semana, sendo terças e quintas-feiras. O HICD, é o principal centro de atendimento médico infantil do Estado de Rondônia, sendo uma das Unidades de Saúde pertencentes à Secretaria de Estado da Saúde (SESAU/RO).

4.1.1 Critérios de inclusão

- Crianças de 0 a 6 anos;
- Quadro clínico sugestivo de infecção respiratória aguda como: tosse, febre, coriza, secreção pulmonar, dispneia, prurido ocular e otalgia após avaliação clínica realizada pelo médico do HICD;
- Preenchimento da ficha de investigação epidemiológica elaborada pelo grupo de estudo (Anexo III).

4.1.2 critérios de exclusão

- Crianças maiores de 6 anos;
- Crianças menores que estavam com outro tipo de infecção;
- Crianças cujos pais ou responsáveis que não aceitaram ou não assinaram TCLE.

4.1.3 Aspectos éticos

O presente estudo utilizou amostras biológicas armazenadas, que foram coletadas para realização do projeto de pesquisa intitulado: “Perfil epidemiológico e molecular das infecções agudas respiratórias em população infantil na região metropolitana de Porto Velho-RO”, protocolo de pesquisa aprovado pelo Comitê de Ética em Pesquisas envolvendo seres humanos do Centro de Pesquisa em Medicina Tropical (CEP/CEPEM), sob o número do parecer 17/11, CAAE: 0007.0.046.000-11.2010 (ANEXO I).

4.2 COLETA E REGISTRO DE DADOS

O responsável legal por cada criança incluída no estudo foi informado pelo pesquisador quanto aos objetivos da pesquisa e metodologia a ser utilizada, e forneceu consentimento através do preenchimento e assinatura do Termo de Consentimento Livre e Esclarecido (TCLE), constante no ANEXO II, além de responder um questionário sócio epidemiológico padronizado pelo Centro de Pesquisa em Medicina Tropical-CEPEM.

4.3 PROCEDIMENTOS DA COLETA E TRANSPORTE DA AMOSTRA

As amostras foram coletadas pelo pesquisador, previamente treinado pelo setor de microbiologia especial do Laboratório de Microbiologia localizado no CEPEM. Para realizar o procedimento foram utilizados três *swabs* de Rayon Tamponado e um Tubo Falcon contendo 3 ml de solução salina fisiológica. O *swab* era introduzido em uma cavidade nasal e esfregado delicadamente com movimentos circulares pressionando-o contra a parede lateral do nariz. Depois o coletor era removido da narina do paciente cuidadosamente e colocado no Tubo Falcon

contendo a solução salina fisiológica. Este mesmo procedimento era realizado na outra cavidade nasal com outro *swab*.

Todas as amostras coletadas foram transportadas para o Laboratório de Microbiologia do CEPEM, acondicionadas sob refrigeração (4°C) para assegurar a sobrevivência dos microrganismos.

4.4 TRATAMENTO DA AMOSTRA

As amostras foram homogeneizadas no vortex e plaqueadas nos meios de culturas agar chocolate, agar sangue (sistematicamente), agar Columbia (para pesquisa de estafilococos), Mac-Conkey (para pesquisa de Gram negativo) e agar Sabouraud (pesquisa de fungos), além de serem submetidas a coloração de Gram.

As placas de agar sangue e agar chocolate foram incubadas por 24h em atmosfera a 5% CO₂ a 37°C e agar Columbia, Mac-Conkey e Sabouraud em atmosfera normal a 37°C.

4.5 REAÇÃO EM CADEIA POLIMERASE PARA AMPLIFICAÇÃO DO GENE RIBOSSOMAL 16S

Todas as amostras semeadas e que cresceram nas placas, sendo identificadas como bactérias, foram submetidas à Reação em Cadeia da Polimerase (PCR- *polymerase chain reation*), para amplificação do gene ribossomal 16S, que é um gene conservado em todas as bactérias.

Para amplificação do gene ribossomal 16S, utilizamos um mix contendo 98 µL de água H₂O de Milli Q e 1 µL de cada *primer sense* 5' CAC GAG CTG ACG ACA C 3' e *antisense* 5' GYC CAD ACW CCT ACG G 3'. Foram utilizadas colônias isoladas diretamente da placa de cultura correspondente. Para tanto, amostras de bactérias foram semeadas em meio ágar sangue suplementada com 5% de sangue desfibrinado de carneiro e incubadas por 24 horas em atmosfera de gás carbônico

(CO₂) e adicionadas a um mix da PCR contendo: 16,8 µL de H₂O de Milli Q, 2,0 µL de DNTP (2,5 mM), 2,0 µL de Buffer (10xPCR, 2,5 mM), 2,0 µL de MgCl₂ (50 mM), 2,0 µL de Primers (10 p/Mol) e 0,2 µL de Taq polimerase (5 U/µL) formando um volume final de 25 µL.

Para a quantificação por fluorescência adicionou-se alíquota de 2 µL de DNA extraído e, após isto, adicionou-se 2 µL de tampão de migração (0,025% de Azul de Bromofenol e 60% de Glicerol) seguido de uma breve homogeneização com a micropipeta. A migração da amostra foi realizada em 100 mL de gel de agarose 1% (p/v) preparado previamente com solução tampão TBE 0,5x (108 g de Tris, 55 g de ácido bórico, 20 mM de EDTA para 1 litro de solução em H₂O, esterilizado por autoclavagem). A eletroforese foi realizada utilizando-se uma voltagem de 50 V por um período de 30 minutos e, após isto, o gel foi transferido para um Transiluminador UV para visualização da fluorescência sendo a quantificação verificada através da intensidade da emissão e comparada a um peso molecular de 1Kb sendo em seguida fotodocumentados.

4.6 PURIFICAÇÃO DO PRODUTO DA PCR

Os produtos das amplificações que obtiveram resultado positivo e que possuíam tamanho e quantidade desejáveis foram purificados com o kit comercial de purificação QIAGEN (*Sample & Assay Technologies*) no qual os restos de *primers* e de dNTPs não utilizados durante o processo de amplificação são removidos a fim de evitar interferências no processo de sequenciamento das amostras.

4.7 REAÇÃO DE SEQUENCIAMENTO

O sequenciamento foi realizado utilizando Sequenciador automático de DNA - ABI 3100 do Centro e Pesquisa Gonçalo Moniz - Fiocruz.

4.8 COMPARAÇÃO DA SEQUÊNCIA COM O PROGRAMA HUMAN ORAL MICROBIOME DATABASE (HOMD)

O resultado do sequenciamento foi extraído para um arquivo próprio em formato FASTA e submetida ao programa Human Oral Microbiome Database (HOMD) que identifica os resultados mais próximos de sequências 16S rRNA enviados pelos usuários entre o HOMD ou outras sequências do gene 16S rRNA (<http://www.homd.org/index.php>).

4.9 IDENTIFICAÇÃO BIOQUÍMICA DAS AMOSTRAS SEQUENCIADAS

As amostras sequenciadas sugestivas de *S. pneumoniae*, foram submetidas a provas bioquímicas para caracterização e identificação final desta bactéria.

4.9.1 Caracterização morfológica

A partir do crescimento em agar sangue foi realizado um esfregaço de uma colônia isolada em uma gota de solução salina a 0,85%, em lâmina de microscópio, com posterior secagem à temperatura ambiente e fixação em chama de bico de Bunsen. Em seguida, a preparação foi coberta com o corante cristal violeta durante 1 minuto, lavando-se em seguida com água. Acrescentou-se, então o lugol, por 1 minuto, sendo, que, nesta etapa, tanto as bactérias Gram-positivas quanto as Gram-negativas adquirem a coloração violeta devido à formação de um complexo insolúvel (corante-iodo) na parede celular e citoplasma. Após uma segunda lavagem com água, a preparação foi descorada rapidamente (aproximadamente 10 segundos) com uma solução álcool-acetona que dissolve a porção lipídica da membrana externa das bactérias Gram-negativas e o complexo corante-iodo é removido,

descolorando a célula. Por outro lado, nas bactérias Gram-positivas, o complexo fica retido na parede rica em peptidoglicano. Em seguida, foi realizada a coloração com fucsina durante 1 minuto, observando-se ao microscópio óptico após a devida secagem à temperatura ambiente.

S. pneumoniae apresenta-se pela coloração do Gram como bactérias Gram-positivas, agrupadas aos pares (diplococos) com formato lanceolar ou em cadeias curtas.

4.9.2 DETERMINAÇÃO DA ATIVIDADE HEMOLÍTICA E CATALÍTICA

Para avaliação das características morfológicas e da atividade hemolítica e catalítica, as amostras foram semeadas em agar sangue e incubadas à 37 °C, por 24 horas em atmosfera contendo CO₂ a 5%. A partir de culturas, assim obtidas, foram observadas as características coloniais e de atividades hemolíticas e catalíticas. Colônias α hemólise, arredondadas, exibindo uma depressão central, foram consideradas sugestivas de *S. pneumoniae* (FACKLAM & WASHINGTON II, 1991). Para a análise da atividade catalítica foi adicionado em uma lâmina uma porção do isolado de uma cultura de 18-24 horas sendo adicionado 2 gotas de peróxido de hidrogênio 3%, observando a formação de bolhas de ar.

4.9.3 Teste de susceptibilidade à optoquina e bacitracina

Para o teste de susceptibilidade a optoquina as amostras foram previamente cultivadas em 4 mL de caldo Schaedler e levadas para a estufa bacteriológica a uma temperatura de 37 °C, durante um período de 18 a 24 horas em atmosfera de 5% de CO₂. No dia seguinte, as amostras foram retiradas da estufa e cerca de 75 µL do caldo Schaedler contendo a bactéria foi adicionado a uma solução fisiológica estéril (NaCl 0,85%) até se obter uma turvação compatível com o grau 0,5 na escala Mac Farland. Posteriormente, um *swab* estéril foi embebido nesta

suspensão bacteriana, sendo comprimido contra a parede do tubo para se retirar o excesso, e em seguida semeado em placa contendo agar sangue de forma a abranger toda a superfície da placa. A seguir, discos de papel de filtro impregnados com 5 µg de cloridrato de etil-hidrocupreína, foram aplicados sobre a superfície dos meios inoculados. Após incubação por 18-24 horas, à 37 °C em atmosfera contendo CO₂ a 5% as zonas de inibição ao redor do disco foram medidas. Amostras apresentando zonas de inibição de crescimento com diâmetro \geq 14 mm foram consideradas como sensíveis a optoquina (ROUFF, WHILEY & BEIGHTON, 2003). A amostra ATCC 49619 foi utilizada como controle positivo.

Para o teste de suscetibilidade a bacitracina o processo de semeadura foi semelhante à da optoquina, onde foi aplicado um disco de papel filtro impregnado de bacitracina e incubado por 18-24, à 37 °C sem CO₂. Amostras que apresentaram qualquer halo de inibição foram consideradas sensíveis a bacitracina (OPAS/MS, 2013).

4.9.4 Teste de bile solubilidade

Para o teste bile solubilidade foram utilizadas as placas do teste de suscetibilidade a optoquina. Na placa com o crescimento bacteriano foram adicionadas 4 gotas de desoxicolato de sódio a 2% diretamente na colônia e observado a lise bacteriana no período de 15 a 30 minutos. As colônias que sofreram lise bacteriana foram consideradas *S. pneumoniae*.

4.9.5 Teste bile esculina

O teste da bile esculina foi realizado sendo adicionado uma porção do crescimento bacteriano incubado por 18-24 horas, à 37 °C em atmosfera contendo CO₂ a 5% a 30 ml de bile esculina em um tubo com rosca, sendo observado por 24-48 horas. A bile esculina é um meio seletivo e diferencial recomendado para a

diferenciação de *enterococos E* do grupo *Streptococcus bovis* de outros *estreptococos*. Os *enterococos* e certos *estreptococos* hidrolisam a esculina produzindo esculetina e glicose. A esculetina reage com o citrato férrico da fórmula formando um complexo marrom escuro ou negro. Para o *S. pneumoniae* a bile esculina é negativa.

4.9.6 Teste CAMP

Para o teste CAMP, foram inoculados uma estria única de uma amostra de *Staphylococcus aureus* produtor de beta lisina (ATCC 25923) no centro de uma placa de ágar sangue e as amostras a serem testadas em estrias formando um ângulo reto com a linha de inoculação da amostra teste de *estafilococo* como separação de 1 mm de distância, e deste modo várias amostras foram testadas em uma mesma placa de ágar sangue sendo em seguida incubadas a 37 ° C durante um período de 18-24 horas em tesão de CO₂. A positividade da prova, *Streptococcus agalactiae* (grupo B), é evidenciada pelo alargamento da zona de lise, que adquire a forma de ponta de flecha característica, na área de intersecção entre as duas estrias. Para a *S. pneumoniae* não ocorre esse alargamento.

4.10 TESTES DE SUSCEPTIBILIDADE AOS ANTIMICROBIANOS (TSA)

4.10.1 Teste de difusão em disco

As amostras foram submetidas ao teste de sensibilidade aos antimicrobianos (TSA), pelo método de difusão em disco de Kirby & Bauer, conforme recomendado pelo *Clinical and Laboratory Standards Institute* (CLSI, 2013). A fim de se detectar e estabelecer fenotipicamente o perfil de sensibilidade bacteriana in vitro, frente aos agentes antimicrobianos.

Antes da realização do teste de sensibilidade, placas contendo ágar Sangue foram preparadas com espessuras de aproximadamente 4 mm, o que corresponde a 25 mL do meio por placas de 90x15mm. As placas devem conter a espessura média de 4 mm não podendo ser inferior a 3 mm ou superior a 5 mm para não ter resultados falsos.

Para a realização do teste de sensibilidade aos antimicrobianos as amostras foram previamente cultivadas em 4 mL de caldo Schaedler e levadas para a estufa bacteriológica a uma temperatura de 37 °C, durante um período de 18 a 24 horas em atmosfera de 5% de CO₂. No dia seguinte, as amostras foram retiradas da estufa e cerca de 75 µL do caldo Schaedler contendo a bactéria foi adicionado a uma solução fisiológica estéril (NaCl 0,85%) até se obter uma turvação compatível com o grau 0,5 na escala Mac Farland. Posteriormente, um *swab* estéril foi embebido nesta suspensão bacteriana, sendo comprimido contra a parede do tubo para se retirar o excesso, e em seguida semeado em placa contendo agar sangue de forma a abranger toda a superfície da placa.

Após um período de 15 minutos, os discos impregnados com antibióticos foram colocados sobre a superfície do meio com o auxílio de uma pinça flambada e resfriada, exercendo-se uma leve pressão com a ponta da pinça para uma boa adesão dos discos. Em seguida, as placas foram incubadas em estufa bacteriológica a 37 °C por 18-24 horas em atmosfera de 5% de CO₂. Posteriormente, as placas foram retiradas da estufa e com o auxílio de uma régua, o diâmetro dos halos inibitórios de cada disco de antibiótico foi medido e anotado para posterior consulta na tabela recomendada pelo CLSI, a fim de determinar se a bactéria em análise é Sensível (S), Intermediário (I) ou Resistente (R) aos antibióticos testados (Tabela 1).

Tabela 2 - Diâmetro do halo de inibição para cada classe de antibiótico testado, de acordo com as recomendações do CLSI (2013)

CLASSE	ANTIBIÓTICO	S	I	R
Penicilina	Oxacilina (1 µg)	≥ 20	-	-
Glicopeptídeos	Vancomicina (30µg)	≥ 17	-	-
Macrolídeos	Azitromicina (15 µg)	≥ 18	14-17	≤ 13
Tetraciclina	Tetraciclina ((30 µg)	≥ 23	19-22	≤ 18
Inibidores de folato	Trimetroprime (30 µg)	≥ 19	16-18	≤ 15
Fenicóis	Cloranfenicol (30 µg)	≥ 21	-	≤ 20
Ansamicinas	Rifampicina (5 µg)	≥ 19	17-18	≤ 16
Lincosaminas	Clindamicina (2 µg)	≥ 19	16-18	≤ 15

4.10.2 Determinação da cim pela técnica de E-TEST (*Epsilometer Test*)

A determinação da CIM foi realizada pela técnica de inibição de crescimento em meio ágar sangue contendo uma fita com gradiente de concentração da droga. Esse teste é chamado de *epsilometer-test* (E-test), sendo baseado numa combinação de conceitos de testes de diluição e difusão. Como os métodos de CIM, o E-test quantifica diretamente a sensibilidade antimicrobiana e difere do método disco convencional pelo uso de um gradiente pré-formado e estável de antimicrobiano, pois consiste numa fita plástica fina, inerte e não porosa de 5 mm de largura e 50 mm de comprimento. Um lado da fita é marcado com uma escala de leitura de CIM em µg/mL. Um código de letras designa a identidade do antibiótico.

Para a realização do E-test as amostras foram previamente cultivadas em 4 mL de caldo Schaedler e levadas para a estufa bacteriológica a uma temperatura de 37 °C, durante um período de 18 a 24 horas em atmosfera de 5% de CO₂. No dia seguinte, as amostras foram retiradas da estufa e cerca de 75 µL do caldo Schaedler contendo a bactéria foi adicionado a uma solução fisiológica estéril (NaCl 0,85%) até se obter uma turvação compatível com o grau 0,5 na escala Mac Farland. Posteriormente, um *swab* estéril foi embebido nesta suspensão bacteriana, sendo

comprimido contra a parede do tubo para se retirar o excesso, e em seguida semeado em placa contendo ágar sangue de forma a abranger toda a superfície da placa.

Após um período de 15 minutos as fitas impregnadas com antibiótico foram colocados sobre a superfície do meio com o auxílio de uma pinça flambada e resfriada, exercendo-se uma leve pressão com a ponta da pinça para uma boa adesão da fita. Em seguida, as placas foram incubadas em estufa bacteriológica a 35 °C por 18-24 horas em atmosfera de 5% de CO₂. A leitura foi realizada através da observação do ponto de intersecção do crescimento bacteriano com a fita, o qual identifica a menor concentração do antibiótico capaz de inibir o crescimento bacteriano. A cepa padrão utilizada como controle de qualidade dos antibiogramas foi ATCC 49619. O ponto de corte das CIM para Benzylpenicillin foram de CIM ≤ 2 µg/mL, sensível, CIM igual a 4 µg/mL, resistência intermediária e CIM ≥ 8 µg/mL, resistência plena (CLSI 2013).

4.11 DETECÇÃO DE BIOFILME POR ESPECTROFOTOMETRIA

As amostras que foram positivas para a espécie *S. pneumoniae* foram testadas quanto a capacidade de formação de biofilme. Para isso as amostras e o controle positivo (EAEC 042) e o controle negativo (DH10B) e o caldo Schaedler sem bactéria, foram previamente cultivados em 4 ml de caldo Schaedler e incubados em estufa bacteriológica a 37 °C durante o período de 18 a 24 horas.

Após esse período de incubação, as amostras foram retiradas da estufa e uma alíquota contendo cerca de 75 µL do caldo Schaedler com a bactéria foi retirada da estufa e diluída em solução salina (0,85) para a obtenção de uma escala de turbidez equivalente a 0,5 Mac Farland (LABORCLIN), a qual corresponde a aproximadamente 1,5x10⁸ unidade formadoras de colônias (UFCs). Posteriormente, 1 µL desta solução na escala de 0.5 Mac Farland, foi retirado e colocado em 1,5 mL de caldo Schaedler, com a finalidade de obter uma concentração aproximada de 100.000 UFC/mL.

Em seguida, 100 µL desta solução foi distribuída nos poços de uma microplaca de 96 poços (fundo reto), em triplicata para cada amostra, inclusive para

o controle positivo (EAEC 042) e para o controle negativo (DH10B) e o caldo Schaedler sem a bactéria. Também foi feito o espelho da microplaca, a fim de se obter a informação correta quanto a localização das amostras. Posteriormente, a microplaca foi incubada em estufa bacteriológica a 37 °C por um período de 18 a 24 horas.

Após o período de incubação, a microplaca foi retirada da estufa e o conteúdo de cada poço foi retirado e lavado 4 vezes com 200 µL de PBS (OBS: após cada lavagem, a microplaca foi levada ao agitador Kline por um período de 1 a 2 minutos). Posteriormente, a microplaca foi incubada em estufa bacteriológica a 60 °C por 1 hora para secagem. Logo após esse período de incubação, a microplaca foi retirada da estufa e as amostras foram coradas com 200 µL de cristal violeta 5% por um período de 1 minuto.

Em seguida, a microplaca foi lavada 4 vezes com 200 µL de água de torneira, e levada ao agitador Kline por um período de 1 a 2 minutos após a lavagem. Na última lavagem todo conteúdo do orifício da microplaca foi retirado e 200 µL de SDS a 1% foi adicionado em cada poço por um período de 15 minutos. Após isso, foi realizada a leitura da microplaca em espectrofotômetro a um comprimento de onda de 640 nm.

A intensidade da cor azul/violeta nos poços da microplaca indica aderência bacteriana. Baseando-se na intensidade da cor e nos valores obtidos no espectrofotômetro as amostras foram agrupadas em 3 categorias: Não aderente (NA), quando o valor da densidade óptica (DO) foi menor ou igual a 0,120 nm, Fracamente aderente (FCA), quando o valor da densidade óptica foi entre 0,121 e 0,240 nm, ou Fortemente aderente (FMA), quando o valor da densidade óptica foi maior ou igual a 0,241 nm (STEPANOVIC et al., 2007).

4.12 EXTRAÇÃO DE DNA GENÔMICO

Os isolados de *S. pneumoniae* foram submetidos a extração do DNA genômico pelo método Fenol/Clorofórmio, e armazenados a -20 °C para posterior utilização na pesquisa de sorotipos.

Para a realização da extração de DNA genômico, as bactérias foram previamente cultivadas em 4 mL de caldo Schaedler e incubadas em estufa bacteriológica a 37 °C por um período de 18 a 24 horas em atmosfera de 5% de CO₂. Após esse período, as amostras foram retiradas da estufa e 1,5 mL de caldo *Schaedler* contendo as bactérias foram coletados e transferidos para microtubos de 1,5 mL do tipo “*Eppendorf*” para posterior centrifugação a 12.000 RPM durante 10 minutos.

Após a centrifugação, as amostras foram retiradas da centrífuga e o *pellet* formado foi ressuspendido em 300 µL de tampão TEM (Tris 0,05M; EDTA 0,05M; NaCl 0,10M), seguido da adição de 30 µL de lisozima (20mg/ml) e incubação a temperatura ambiente por 30 minutos. Em seguida, foram adicionados 50 µL de Triton X-100 a 10% e 20 µL de NaCl 3M. Após isso, os microtubos contendo as amostras foram aquecidos a 60 °C em banho seco, por 5 minutos e deixados a temperatura ambiente até resfriar. Logo após essa etapa, foram adicionados 3 µL de RNase (10 mg/mL) e os microtubos foram incubados em estufa bacteriológica a 37 °C por 30 minutos.

Posteriormente, as amostras foram retiradas da estufa e foram adicionados 50 µL de SDS 10% e 3 µL de proteinase K (10 mg/mL), seguida de uma nova incubação a 37 °C por 30 minutos. Logo após, foram adicionados 400 µL de fenol, seguido de agitação por 5 minutos (sem auxílio de vortex) e centrifugação a 12.000 RPM durante 10 minutos. Após a centrifugação, o sobrenadante foi recuperado e transferido para um novo microtubo do tipo “*Eppendorf*”.

Após a troca de microtubos, foram adicionados 400 µL de clorofórmio, seguido de agitação por 5 minutos (sem auxílio de vortex) e centrifugação a 12.000 RPM durante 10 minutos. Posteriormente o sobrenadante foi recuperado e foi realizado novamente a troca de microtubo, sendo adicionado 40 µL de NaCl 3 M e vagorosamente 1 mL de etanol 100%. Em seguida os microtubos contendo as amostras foram centrifugados por 10 minutos a 12.000 RPM e o sobrenadante foi descartado. O sedimento contido no microtubo foi ressuspendido em 1 mL de etanol 70% e uma nova centrifugação a 12.000 RPM por 10 minutos foi realizada.

Logo após a centrifugação, o sobrenadante foi descartado e o sedimento foi levado ao fluxo laminar para secagem. Posteriormente, o sedimento foi ressuspendido em 200 µL de tampão TE (Tris-EDTA) e estocado a -20 °C.

4.13 SOROTIPAGEM DE *S. pneumoniae* ATRAVÉS DE MULTIPLEX PCR

A sorotipagem capsular de *S. pneumoniae* foi realizada através da técnica de Multiplex PCR e para cada reação foram utilizados os seguintes componentes: 1 µL de DNA da bactéria de interesse na pesquisa, 15,8 µl de água de MiliQ autoclavada, 2,0 µL de DNTP (2,5 mM), 2,0 µL de Buffer (10xPCR 2,5 mM), 2,0 µL de MgCl₂ (50 mM), 2,0 µL (10 p/mol) de Primers específico para cada sorotipo (Tabela 2) e 0,2 µL (50 mM) de Taq DNA polimerase (Invitrogen), formando um volume final de 25 µL.

As condições de amplificação para cada sorotipo foram realizadas de acordo com Coskun-Ari e colaboradores (2012) em um aparelho termociclador da Applied Biosystems sob as seguintes condições: 95 ° C durante 10 minutos, seguido por 30 ciclos de amplificação 95 ° C por 50 s, 55 ° C por 30 s, 65 ° C por 2,5 min, e um ciclo de 65 ° C durante 10 min.

4.14 ELETROFORESE

Para visualização dos produtos de PCR, as amostras foram submetidas à eletroforese (MiniRun GE-100) em gel de agarose 2%, contendo o tampão de corrida TBE (Tris Borato EDTA) a uma concentração de 0,5x, e coradas com GelRed 10.000x (diluição de 1:5000). Posteriormente, as amostras foram visualizadas em Luz Ultravioleta (UV) com o auxílio do transiluminador e fotodocumentados por este mesmo aparelho.

4.15 ANÁLISE ESTATÍSTICA

As análises estatísticas aplicadas no presente estudo foram realizadas utilizando testes não paramétricos, através do programa GRAPHPAD PRISM 6.0 como o Teste Exato de Fisher e o Odds Ratio. A significância estatística foi definida como $p < 0,05$.

Tabela 3 - Sequências de primer utilizados para amplificação dos sorotipos.

Primer	Sequencia (5' → 3')	pb	Referência
1	F CTCTATAGAATGGAGTATATAAACTATGGTTA R CCAAAGAAAATACTAACATTATCACAATATTGGC	280	Pai <i>et al.</i> , 2006.
3	F ATGGTGTGATTTCTCCTAGATTGGAAAGTAG R CTTCTCCAATTGCTTACCAAGTGCAATAACG	371	Pai <i>et al.</i> , 2006.
4	F CTGTTACTTGTTCTGGACTCTCGATAATTGG R GCCCACTCCTGTTAAAATCCTACCCGCATTG	430	Pai <i>et al.</i> , 2006.
5	F ATACCTACACAACCTTCTGATTATGCCTTTGTG R GCTCGATAAACATAATCAATATTTGAAAAAGTATG	362	Pai <i>et al.</i> , 2006.
6A/B	F AATTTGTATTTTATTCATGCCTATATCTGG R TTAGCGGAGATAATTTAAAATGATGACTA	250	Pai <i>et al.</i> , 2006.
7 ^a	F CCTACGGGAGGATATAAAATTATTTTTGAG R CAAATACACCATATAGGCTGTTGAGACTAAC	826	Pai <i>et al.</i> , 2006.
9V	F CTTCTGTTAGTTAAAATTCTAAATTTTTCTAAG R GTCCCAATACCAGTCCTTGCAACACAAG	753	Pai <i>et al.</i> , 2006.
14	F GAAATGTTACTTGGCGCAGGTGTCAGAATT R GCCAATACTTCTTAGTCTCTCAGATGAAT	189	Dias <i>et al.</i> , 2007
18C	F CTTAATAGCTCTCATTATTCTTTTTTTAAGCC R TTATCTGTAAACCATATCAGCATCTGAAAC	573	Pai <i>et al.</i> , 2006.
19 ^a	F GTTAGTCCTGTTTTAGATTTATTTGGTGATGT R GAGCAGTCAATAAGATGAGACGATAGTTAG	478	Pai <i>et al.</i> , 2006.
19F	F GTTAAGATTGCTGATCGATTAATTGATATCC R GTAATATGTCTTTAGGGCGTTTATGGCGATAG	304	Pai <i>et al.</i> , 2006.
23F	F GTAACAGTTGCTGTAGAGGGAATTGGCTTTTC R GAATATTTTCATTATCAGTCCCAAGTC	384	Pai <i>et al.</i> , 2006.

5.0 RESULTADOS

5.1 FREQUÊNCIA DOS ISOLADOS DE *S. pneumoniae*

Neste estudo foram coletadas 660 amostras de secreção nasofaringe de crianças de 0 – 6 anos com o quadro de IRA. Um total de 1.900 colônias bacterianas foram isoladas e submetidas à Reação em Cadeia Polimerase (PCR), para amplificação do gene ribossomal 16S. Após a realização da PCR, 391 amostras amplificaram satisfatoriamente para o referido gene, sendo então purificadas e enviadas para sequenciamento. Dos isolados submetidos ao sequenciamento, 313 foram identificados a nível de gênero ou espécies (Tabela 4).

Tabela 4 - Resultados do sequenciamento do gene ribossomal 16S

Espécie	Quantidade	%
<i>Streptococcus sp.</i>	130	41,5
<i>Staphylococcus sp.</i>	48	15,3
<i>Staphylococcus epidermis</i>	24	7,6
<i>Granulicatella adiacis</i>	23	7,3
<i>Neisseria sp.</i>	18	5,7
<i>Rothia mucilaginosa</i>	12	3,8
<i>Agrobacterium tumefaciens</i>	08	2,5
<i>Moxarella catarrhalis</i>	08	2,5
<i>Staphylococcus aureus</i>	08	2,5
<i>Corynebacterium sp.</i>	06	1,9
<i>Rolstonia sp.</i>	06	1,9
<i>Microbacterium sp.</i>	06	1,9
<i>Kocuria sp.</i>	04	1,3
<i>Acinetobacter baumannii</i>	02	0,6
<i>Bacillus subtilis</i>	02	0,6
<i>Enterobacter sp.</i>	02	0,6
<i>Escherichia coli</i>	02	0,6
<i>Pseudomonas aeruginosa</i>	02	0,6
<i>Abiotrophia defectiva</i>	02	0,6
<i>Haemophilus sp.</i>	01	0,3
<i>Lactobacillus fermentum</i>	01	0,3

Após o sequenciamento constatamos que 130 isolados eram sugestivos de *Streptococcus sp.* Para a identificação final de *S. pneumoniae*, foram realizados coloração de Gram, testes bioquímicos, testes de atividade hemolítica, suscetibilidade a optoquina, suscetibilidade a bacitracina, bile solubilidade, bile esculina, catalase e prova CAMP, apresentando resultados conforme tabela 5.

Tabela 5 - Resultados dos isolados identificados de *Streptococcus sp.*

Espécie	Quantidade	%
<i>Streptococcus pneumoniae</i>	59	45,3
<i>Streptococcus agalactie</i>	26	20,1
<i>Streptococcus sp</i> (NC)	25	19,2
<i>Streptococcus do grupo D</i>	11	8,5
<i>Streptococcus viridans</i>	09	6,9
Total	130	100

NC – Não caracterizadas

Após a realização dos testes bioquímicos verificou-se que 45,3% (59/130) foram identificados como *S. pneumoniae*, não sendo possível a caracterização de 25 amostras, sendo necessária a realização de outros testes.

5.2 CARACTERÍSTICAS EPIDEMIOLÓGICAS DOS PORTADORES DE *S. pneumoniae*

Conforme apresentado na Tabela 6, a taxa de portadores de *S. pneumoniae* entre as crianças estudadas foi de 8,9% (59/660), sendo 50,8% (30/59) do sexo masculino e 49,2% (29/59) do sexo feminino. Observando-se maior taxa de isolamento nas crianças menores de 23 meses 64,4% (38/59).

Tabela 6 - Características sociodemográficas da população de estudo.

Variável	Isolamento de <i>S. pneumoniae</i>		*p	OR
	Negativo, n (%)	Positivo, n (%)		
População estudada	601 (91,0)	59 (8,9)		
Gênero				
Masculino	330 (54,9)	30 (50,8)	0,5851	0,8495
Feminino	271 (45,1)	29 (49,2)		
Idade (meses)				
< 23	415 (69,0)	38 (64,4)	0,0056	0,4636
24 a 35	100 (16,6)	09 (15,2)		
36 a 47	57 (9,5)	05 (8,5)		
48 a 60	29 (4,8)	07 (11,9)		

*p < 0,05 (teste qui-quadrado de Pearson)

Na tabela 7, apresentamos a relação entre o número de pessoas que convivem com a criança e o tempo onde as mesmas ficam a maior parte do tempo. Verificou-se que a maioria das crianças 56% (33/59) convivem com até 3 pessoas e passam a maior parte do tempo em casa 83% (49/59).

Tabela 7 - Distribuição das crianças colonizadas e não colonizadas pelo *S. pneumoniae* em relação à presença de fatores de risco como aglomeração familiar e onde a criança passa a maior parte do tempo.

Variável	Isolamento de <i>S. pneumoniae</i>		*p	OR
	Negativo, n (%)	Positivo, n (%)		
Nº de pessoas		33 (56)		1.273
Até 3	300 (49,9)	19 (32,2)	0,4145	
4 e 5	191 (31,8)	4 (6,8)		
Mais de 5	98 (16,3)	3 (5,0)		
Não informou	12 (2,0)			
> parte do tempo				
Não informado	315 (52,4)	2 (3,4)	0,0001	6.740
Casa	253 (42,1)	49 (83)		
Creche	15 (2,5)	4 (6,8)		
Escola	18 (3,0)	4 (6,8)		

*p < 0,05 (teste qui-quadrado de Pearson)

Na tabela 8 são apresentados os dados referentes ao grau de instrução da mãe e a renda familiar. Observou-se que 44% (26/59) possuem o ensino fundamental e 40,6% (24/59) possuem o ensino médio. Quanto a renda familiar 50,8% (30/59) declararam possuir renda de um salário mínimo.

Tabela 8 - Distribuição das crianças colonizadas e não colonizadas pelo *S. pneumoniae* em relação à presença de fatores de risco como grau de instrução da mãe e renda familiar.

Variável	Isolamento de <i>S. pneumoniae</i>		*p	OR
	Negativo, n (%)	Positivo, n (%)		
Instrução da mãe				
Não informado	34 (5,6)	02 (3,4)	0,5778	1.202
Ens. Fund.	238 (39,6)	26 (44,0)		
Ensino Médio	278 (46,2)	24 (40,6)		
Superior	51 (8,5)	07 (11,9)		
Renda família				
Não informado	53 (8,8)	04 (6,8)	0,4950	1.243
< 1 salário	52 (8,6)	04 (6,8)		
1 salário	262 (43,6)	30 (50,8)		
2 salários	144 (24,0)	08 (13,6)		
3 salários ou +	90 (15,0)	13 (22,0)		

*p < 0,05 (teste qui-quadrado de *Pearson*)

De acordo com a tabela 9, verificou-se que a maioria dos casos de crianças colonizadas 23,7%% (14/59) pertenciam ao grupo de fumante passivo e 17% (14/59) a associação a asma e fumante passivo.

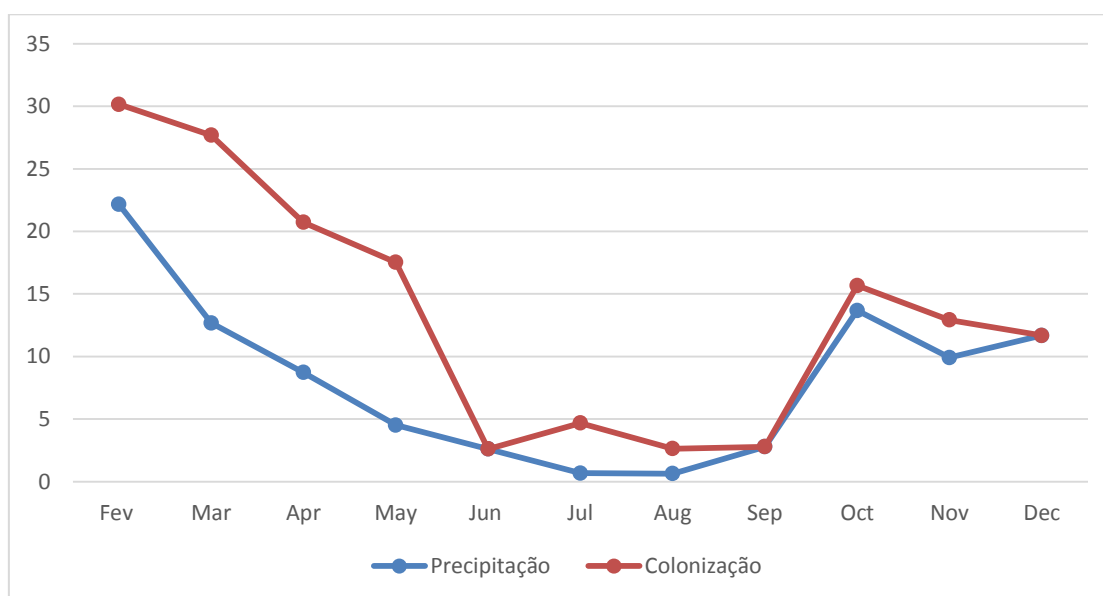
Tabela 9 - Distribuição das crianças colonizadas e não colonizadas pelo *S. Pneumoniae* em relação à presença de fator de risco antecedentes familiares.

Variável	Isolamento de <i>S. pneumoniae</i>		*p	OR
	Negativo, n (%)	Positivo, n (%)		
Sem Antecedentes	232 (38,6)	24 (40,6)	0,028	0,5246
Fumante passivo	96 (16,0)	14 (23,7)		
Asma + Fumante passivo	53 (8,8)	10 (17,0)		
Asma	74 (12,3)	04 (6,8)		
Rinite	54 (9,0)	02 (3,4)		
Tuberculose + Fumante	15 (2,5)	01 (1,7)		
Asma+Rinite+Tuberculose	30 (5,00)			
Rinite + Fumante + Asma	37 (6,1)	04 (6,8)		
Asma + Rinite + Fumante	10 (1,6)	-		

*p < 0,05 (teste qui-quadrado de Pearson)

Na figura 6, apresentamos a relação entre o número de crianças colonizadas e a precipitação pluviométrica.

Figura 6 - Relação entre as crianças colonizadas e a precipitação pluviométrica



Dados climatológicos: fonte (SEDAM)/Estação climatológica de Santo Antônio.

5.3 PERFIL DE SUSCEPTIBILIDADE AOS ANTIMICROBIANOS

Discos impregnados com antibióticos foram utilizados para a realização do teste de sensibilidade aos antimicrobianos: Oxacilina (OXA), vancomicina (VAN), Azitromicina (AZI), tetraciclina (TET), trimetropime (TRI), cloranfenicol (CLO), rifampicina (RIF) e clindamicina (CLI). Quanto ao perfil de suscetibilidade aos antimicrobianos os antibióticos que apresentaram maior frequência de resistência foram TRI 45/59 (76,35%), OXA com 31/59 (52,5%) e AZI 22/59 (37,2%) dos isolados.

Os antibióticos VAN, CLO, RIF, CLI e TET apresentaram alta sensibilidade 59/59 (100%), 58/59 (98,3%), 55/59 (93,2%), 51/59 (86,4%) e 40/59 (67,7%) respectivamente (Tabela 10).

Tabela 10 - Perfil de susceptibilidade aos antimicrobianos dos 59 isolados de *S. pneumoniae* isolados de crianças com IRA pelo método de difusão de disco.

ANTIBIÓTICOS	RESULTADOS (n = 59)					
	Sensível	%	Intermediário	%	Resistente	%
Oxacilina (OXA)	28/59	47,5	-	-	31/59	52,5
Vancomicina (VAN)	59/59	100	-	-	-	-
Azitromicina (AZI)	20/59	33,8	17/59	28,8	22/59	37,2
Tetraciclina (TET)	40/59	67,7	15/59	25,4	04/59	6,7
Trimetropina (TRI)	02/59	3,4	12/59	20,3	45/59	76,3
Cloranfenicol (CLO)	58/59	98,3	01/59	1,7	-	-
Rifampicina (RIF)	55/59	93,2	02/59	3,4	02/59	3,4
Clindamicina (CLI)	51/59	86,4	-	-	08/59	13,6

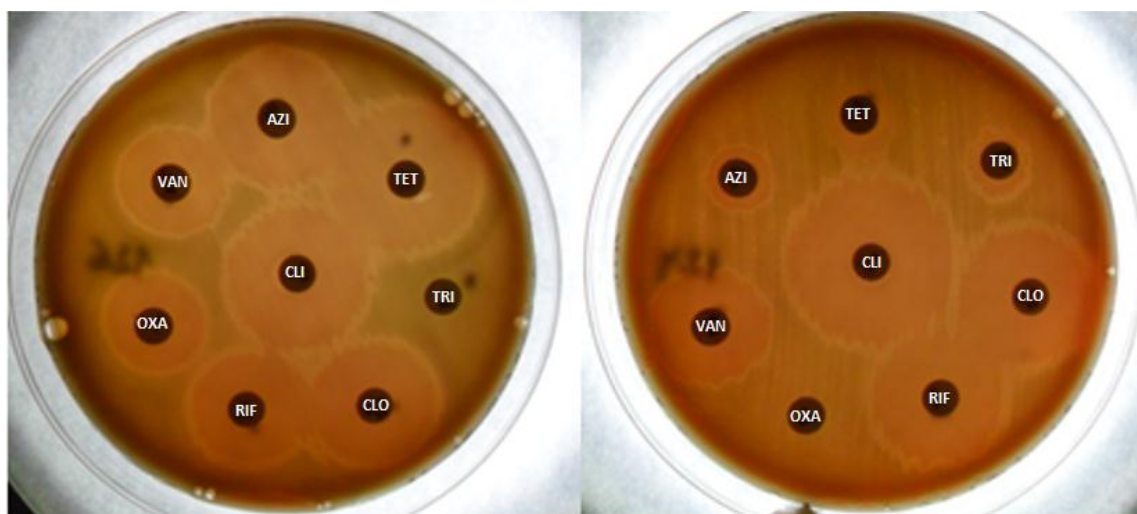
De forma geral a susceptibilidade aos antimicrobiano testado foi alta 88,1% (52/59). A porcentagem de não susceptibilidade à penicilina (para isolados resistentes a oxacilina pelo método de difusão de disco) foi de 10,2% (06/59) intermediário de 1,7% (01/59) de resistência plena (Tabela 11).

Tabela 11 - Perfil de susceptibilidade aos antimicrobianos dos 59 isolados de *S. pneumoniae* isolados de crianças com IRA pelo método de E-test.

ANTIBIÓTICO	RESULTADOS (n = 59)					
	S		I		R	
	CIM \leq 2	%	CIM 4	%	CIM \geq 8	%
Benzylpenicillin	52/59	88,1	06/59	10,2	01/59	1,7

Na figura 7 apresentamos o perfil fenótipo de resistência e sensibilidade aos antimicrobianos testados.

Figura 7 - Teste fenotípico para detecção de sensibilidade aos antimicrobianos (TSA) nos isolados de *S. pneumoniae* oriundos de crianças de 0 a 5 anos, com IRA em Porto Velho/RO.

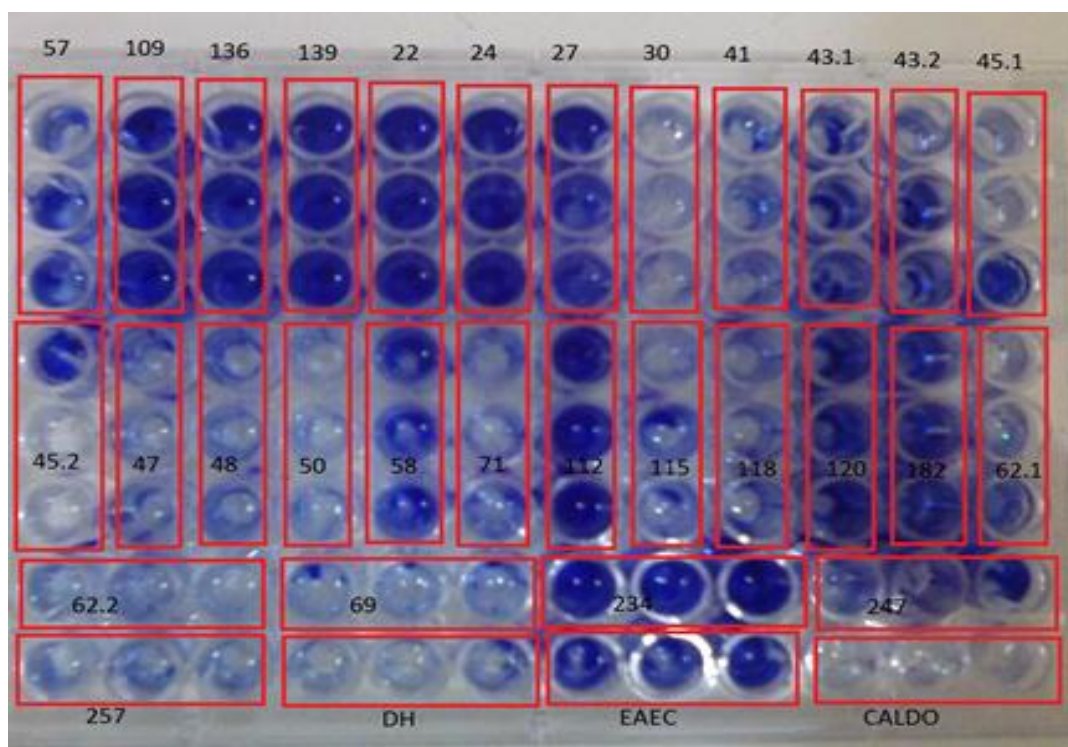


Na placa da esquerda, pode-se observar a resistência a 2 antibióticos (trimetropime, pois não houve halo de inibição e oxacilina apresentando halo $< 20\text{mm}$) os demais antibióticos apresentaram sensibilidade (vancomicina, clorofenicol, rifampicina, clindamicinae tetraciclina e azitromicina). Na placa da direita observa resistência a 4 antibióticos (Oxacilina não houve halo de inibição e halo de inibição inferior ao recomendado pela CLSI 2013, para aos antibióticos azitromicina, tetraciclina e trimetropime) e os antibióticos clindamicina, clorofenicol, vancomicina e rifampicina apresentaram sensibilidade. (Foto do autor)

5.4 CAPACIDADE DE FORMAÇÃO DE BIOFILME POR ESPECTROFOTOMETRIA

Neste estudo pode-se observar que alguns isolados apresentaram a capacidade de formação de biofilme (Figura 8) inclusive com fenótipo fortemente aderente, fato que é preocupante, uma vez que a formação de biofilme é um fator de virulência adicional e um mecanismo de resistência natural da bactéria, tornando-a mais resistente a ação de agentes químicos e físicos, relacionando a persistência bacteriana em casos de infecção, pois a matriz expolissacarídica formada no biofilme impede a penetração de agentes antimicrobianos dificultando a destruição das bactérias no biofilme (MACEDO, 2000; NORMARK & NORMARK, 2002; HALL-STOODLEY & STOODLEY, 2009; KASNOWKI *et al.*, 2010).

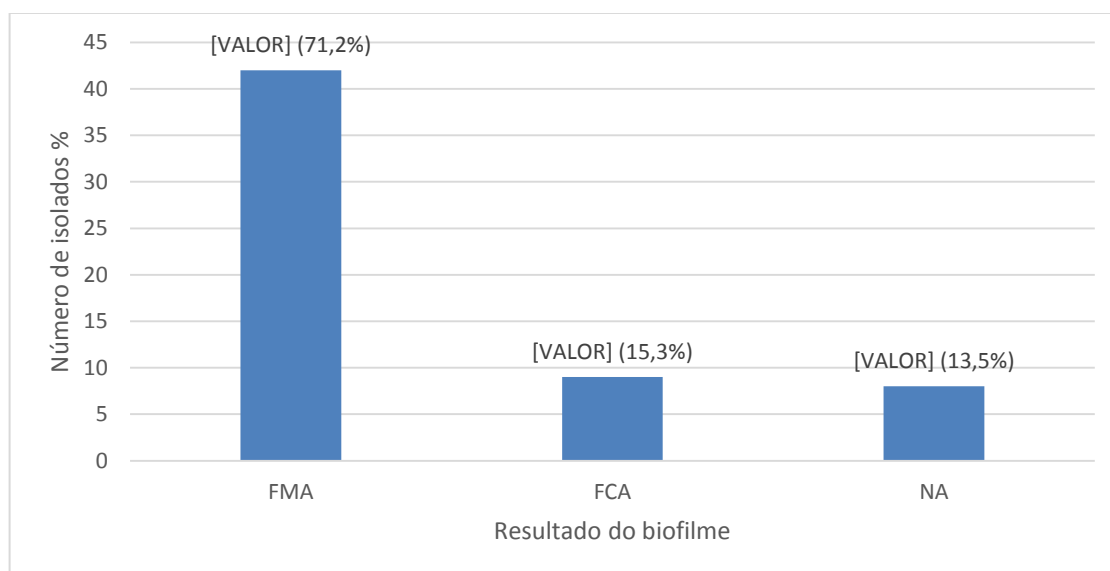
Figura 8 - Resultado do teste de formação de biofilme por espectrofotometria em isolados de *S. pneumoniae*.



Para cada isolado o teste foi realizado em triplicata. Como controle positivo foi utilizado uma cepa de EAEC 042 e como controle negativo uma cepa de DH10B e caldo Schaedler sem bactéria, seguindo os mesmos procedimentos das demais amostras. Nesta imagem observa-se a presença de amostras fortemente aderente-FMA (109, 136, 139, 22, 24, 27, 58, 112, 120, 182 e 234) e fracamente aderente-FCA (57, 43.1, 43.2, 48, 62.1 e 247). As amostras que apresentam uma coloração transparente ou com coloração de roxo quase transparente são não aderentes. (Foto do autor)

Quanto a capacidade de formação de biofilme dos isolados de *S. pneumoniae*, verificou-se que 71,2% (42/59) apresentaram um fenótipo fortemente aderente (FMA), 15,3% (9/59) fracamente aderente (FCA) e 13,5% (8/59) foram não aderentes (NA) (Figura 9).

Figura 9 - Capacidade de formação de biofilme dos isolados de *S. pneumoniae* oriundos de crianças de 0 a 6 anos, com IRA em Porto Velho/RO.



5.5 CORRELAÇÃO ENTRE A RESISTÊNCIA AOS ANTIBIÓTICOS E FORMAÇÃO DE BIOFILME

Observou-se que dos 42 isolados que apresentaram fenotípico fortemente formador de biofilme 54,7% (23/42) apresentaram resistência aos antibióticos no teste de difusão de disco ($p = 0,0008$).

5.6 CARACTERIZAÇÃO DOS SOROGRUPOS/SOROTIPOS

De acordo com o resultado apresentado na tabela 11, todos os 59 isolados de *S. pneumoniae* foram submetidos à sorotipagem por multiplex PCR, sendo testados os seguintes sorotipos: 1, 3, 4, 5, 6A/B, 7F, 9V, 14, 18C, 19A, 19F e 23F.

Tabela 12 - Perfil dos sorotipos testados nas 59 amostras de *S. pneumoniae* isolados de crianças com IRA.

SOROTIPO/SOROGRUPO	AMOSTRA	%
1	-	-
3	-	-
4	-	-
5	-	-
6A/B	-	-
7F	-	-
9V	543	1,7
14	-	-
18C	-	-
19A	-	-
19F	41, 160, 165, 271, 275, 281, 287 e 290	13,6
23F	-	-

5.7 CORRELAÇÃO ENTRE PRESENÇA DE *S. pneumoniae*, *Rinovírus* e *Parainfluenza Humano* (HPIV-1)

Quanto avaliamos a correlação entre os casos positivos de *S. pneumoniae* identificados e sua co-infecção com algum tipo de vírus, observamos que 32,6% (17/52) dos isolados apresentaram a presença do *Rinovírus*. Quanto ao *Parainfluenza Humano* (HPIV-1), nenhuma das amostras que foram positivas apresentaram o referido vírus.

6.0 DISCUSSÃO

O *S. pneumoniae* é um dos principais causadores de doenças do trato respiratório, sendo relevante seu estudo em saúde pública devido sua alta taxa de morbidade e mortalidade na infância, tanto em países desenvolvidos, como em países em desenvolvimento (WHO, 2005).

O presente trabalho caracterizou o perfil dos isolados de *S. pneumoniae* obtidos da nasofaringe de crianças com IRA na região de Porto Velho-RO.

Segundo Kadioglu e colaboradores (2008), todas as doenças pneumocócicas começam com o estabelecimento da colonização, isto é estado de portador. Há vários estudos analisando os fatores de riscos da colonização e as taxas de colonização de *S. pneumoniae* no mundo (BOGAERT et al., 2004; MALFROOT et al., 2004; LAVAL et al., 2006; CHEN et al., 2007; ARTAN et al., 2008). A maioria dos trabalhos correlacionam a taxa de portadores com a resistência à antibiótico bem como além da resistência à antibiótico também os sorotipos mais comuns (DI FABIO et al., 2001; REY et al., 2002; MALFROOT et al., 2004; BAYRAKTAR et al., 2005; CARDOZO et al., 2006; MATSUMOTO et al., 2007; ARTAN et al., 2008).

Vários estudos de colonização por *S. pneumoniae*, foram conduzidos em escolas e creches no Brasil, as quais contituem fatores de risco para a colonização (LAVAL et al., 2006; PIMENTA et al., 2011; NEVES et al., 2013).

Neste estudo encontramos uma taxa de colonização de 8,9% (59/660), o que diverge de outros estudos realizados em outros países e outros estados brasileiros. No Japão, estudos com crianças entre um mês e cinco anos em 1999, encontraram uma taxa de colonização de 60,3% (MASUDA et al., 2002). Estudos com crianças usuárias de creches e jardins de infância entre 1999-2000 em Hong Kong na China, com idade variando entre dois e seis anos, obtiveram uma taxa de colonização de 19,4% (CHIU et al., 2001). Acreditamos que a baixa taxa de colonização encontrada esteja relacionada a dois fatores: ao *primer* utilizado que não foi possível detectar as bactérias devido algum ponto de mutação que as mesmas possam sofrer e com relação as crianças que em sua maioria não frequentavam creches, local de grande disseminação como apresentado em vários estudos.

Nunes e colaboradores (2005) em estudo conduzido em Portugal com crianças usuárias de creches menores de cinco anos relataram uma taxa de colonização de 45,8%.

Hussain e colaboradores (2005); Hare e colaboradores (2013) mostraram em estudo que na Austrália, Alaska e Inglaterra a prevalência de colonização nasofaringeana foi de cerca de 60%.

Estudos realizados em várias regiões do Brasil apresentaram as seguintes taxas de prevalência: 55% em Fortaleza, 49% em Brasília, 49% no Rio de Janeiro e 66% em Salvador (REY et al., 2002; REIS et al., 2008; PIMENTA et al., 2011; NEVES et al., 2013). Há ainda outros estudos que demonstram a prevalência de colonização em crianças que variam de 13,9% a 72%, principalmente entre aquelas que frequentam creches ou berçários (REY et al., 2002; LAVAL et al., 2006).

Aslan e colaboradores (2007) em um estudo na cidade de Mersin, Turquia, com crianças de escolas primárias com idades de seis a treze anos, observaram uma taxa de colonização de 13,9%.

No presente estudo as crianças menores de 23 meses e que não frequentavam creches foram prevalentes 64,4% e 83% respectivamente corroborando com alguns autores, que consideram a taxa de portador inversamente proporcional a faixa etária (CHIU et al., 2001; HAMER et al., 2002; CHEN et al., 2007; MONTEROS et al., 2007; ROCHE et al., 2007). Estudos de Jacobs (2003); Bogaert et al., (2004) mostraram que o pico de incidência de colonização ocorre aos 3 anos de idade (55%), posteriormente ocorre um declínio até os 10 anos de idade com uma prevalência estável em torno de 8%.

Lo e colaboradores (2003), descreveu em seus estudos que a maior prevalência ocorreu na faixa etária entre 2 e 5 anos, bem como um estudo realizado em 2008 em Umuarama (PR) por Velasquez e colaboradores (2009) com crianças que frequentavam creche, observou-se maior taxa de isolamento nas crianças com idade entre 2 e 5 anos (51%) e 39,4% em crianças menores de 2 anos, entretanto DAGAN et al., 1998; NOVALES et al., 1997 e PRINCIPI et al., 1990, demonstraram em seus estudos que a maior taxa de colonização ocorreu entre crianças menores de 2 anos. DAGAN et al., 1998; NOVALES et al., 1997 e PRINCIPI et al., 1999).

Analisando os trabalhos citados, observa-se que há uma grande variação na taxa de portadores sadios, sendo a maioria crianças usuárias de creches. É

importante ressaltar que os resultados obtidos de uma região em particular não podem ser generalizados para todo o país, mesmo porque existem inúmeros fatores sócio-econômicos.

Ao longo do tempo vários estudos vêm demonstrando que a prevalência da colonização do pneumococo na nasofaringe pode ser influenciada por vários fatores como idade, população estudada, área geográfica, sazonalidade e condições ambientais como fumo e aglomerados (creches, quarteis), e os resultados muitas vezes não podem ser extrapolados para populações e períodos temporais diferentes (FREDERICKSEN & HEMRICHSSEN, 1988; MONTGOMERY et al., 1990; DAGAN et al. 1998; BOGAERT et al., 2004; HIL et al., 2008; HSU et al., 2014).

Nosso estudo está de acordo com a literatura pois 23,7% dos casos estavam relacionados a presença de fumante e em 17% dos casos observamos que a associação entre asma e fumante foram estatisticamente significantes (valor de $p = 0,028$). Em relação aos fatores ambientais, observamos maior prevalência de colonização no período de maior pluviosidade. Por outro lado não encontramos correlação entre o isolamento e a aglomeração de pessoas que residem com a criança ($p = 0,4145$) bem como baixa renda familiar de até um salário mínimo 57,6%, (valor de $p = 0,4950$).

No presente estudo também não encontrou correlação entre o sexo e estado de portador, pois o número de criança do sexo masculino foi semelhante ao número de portadoras do sexo feminino, indo de encontro com outros resultados (BOGAERT et al., 2004; OZDEMIR et al., 2008; VELASQUEZ et al., 2009).

A resistência do *S. pneumoniae* aos antimicrobianos foi observada logo após o uso clínico dos mesmos, sendo descrito o primeiro caso de resistência a sulfadiazina em 1943 (FRISCH et al., 1943; CAMPELL et al., 1998).

Após a liberação da penicilina para uso clínico no início da década de 40, até meados dos anos 60, os únicos relatos de penumococos resistentes referiam-se às cepas laboratoriais submetidas às modificações genéticas sucessivas por exposição às doses subletais de antibióticos (APPELBAUM, 1987; AUSTRIAN, 1994; TOMASZ, 1997).

O teste de difusão em disco constitui um método de realização simples, confiável e de baixo custo, baseando-se no diâmetro do halo de inibição do crescimento da bactéria ao redor do disco do antibiótico na placa de agar, sendo

esse resultado apenas qualitativo, ou seja, determina se o agente é sensível ou resistente ao medicamento testado. Este método é empregado na determinação do padrão de sensibilidade do pneumococo a uma série de antimicrobianos (BEDRAN & CAMARGO, 2002).

Os discos de oxacilina são os mais frequentes utilizados por serem mais estáveis e apresentarem melhor correlação entre os seus resultados e valores da CIM e em muitos serviços são os únicos comercialmente disponíveis (BEDRAN & CAMARGO, 2002).

O perfil de suscetibilidade aos antimicrobianos através do teste de difusão de disco, nosso estudo demonstrou altas taxas de resistência frente a três antibióticos: TRI 76,3% (45/59) dos isolados, OXA 52,5% (31/59) dos isolados e AZI 37,2% (22/59) dos isolados.

Os antibióticos que mostraram alta sensibilidade foram: VAN 100% (59/59), CLO 98,3% (58/59), RIF 93,2% (55/59), CLI 86,4% (51/59) e TET 67,7% (40/59).

A concentração inibitória mínima revelou que 88,1% (52/59) foram sensíveis a penicilina, 10,2% (06/59) apresentaram resistência intermediária e 1,7% (01/59) resistência plena, sendo este resultado inferior comparado a outros trabalhos. Estudos de outros autores apresentaram uma taxa de resistência à penicilina alta, que variou de 55% a 63,3% (CHIU et al., 2001; MASUDA et al., 2002; REY et al., 2002; MONTEROS et al., 2007; VELASQUEZ et al., 2009).

Estudos demonstram um aumento na taxa de não susceptibilidade. Reis et al., (2002) em um estudo realizado na cidade de Salvador-BA (1995-1999) apresentou uma taxa de não susceptibilidade de 15% e Menezes et al., (2011) na mesma cidade entre 2000-2007, mostrou que a não susceptibilidade a penicilina foi de 22%. Estudo realizado no Rio de Janeiro por Neves et al., (2013), revelou que a taxa de não susceptibilidade foi de 27%.

Nos países da América do Norte estudos de Echaniz-Aviles e colaboradores (1997) no México, demonstraram taxa de 48% de resistência total. Di Fabio e colaboradores (2001) relataram índices de resistência à penicilina de 46,9%. Estudos de Mantese et al., (2003) mostraram que de 30 cepas de oxacilina resistente, foram confirmadas a resistência a penicilina de 12,8% com nível intermediário e 2,7% com nível pleno.

Estudos realizados em seis países da América Latina (Argentina, Brasil, Chile, Colômbia, México e Uruguai), Kertsz e colaboradores (1998) mostraram que a maior taxa de resistência foi observada no México (47,3%) e a menor foi relatada na Colômbia (12,0%). Rossi et al., (1997) na Argentina demonstraram que a taxa de resistência foi de 24,4%.

Torres e colaboradores (2013) em um estudo realizado em sete regiões do Peru, com crianças saudáveis, menores de dois anos, entre 2007 e 2009 encontraram taxa de resistência de 58% ao cotrimoxazol, 52,2% de resistência a penicilina, 29,1% a tetraciclina, 28,9% a azitromicina e 26,3% a eritromicina.

Nosso estudo se aproxima com alguns autores que relatam uma taxa de resistência à penicilina menor ou igual a 22% (ROSSI et al., 2001; BAYRAKTAR et al., 2005; STRATCHOUNSKI et al., 2006; ASLAN et al., 2007; RIVERA-OLIVERO et al., 2007).

A capacidade de formação de biofilme verificada neste estudo também tem sido demonstrada por vários outros tipos de patógenos, sendo considerada uma importante estratégia de sobrevivência microbiana, pois o desenvolvimento do biofilme permite que a bactéria sobreviva em ambientes hostis e colonize novos nichos por vários mecanismos de dispersão. Vários estudos têm demonstrado a capacidade potencial de formação de biofilme *in vitro*, por cepas de *S. pneumoniae* (BUDHANI & JK, 1997; DONLAN et al., 2004; MOSCOSO et al., 2006 e WAITE et al., 2001).

De acordo com Sanchez e colaboradores (2011); Simell e colaboradores (2012) o significado clínico da formação do biofilme ainda é desconhecido, mas sugere-se que ele auxilie no crescimento do patógeno durante a colonização e contribui para o desenvolvimento de doenças invasivas.

Em um estudo realizado por Romling & Balsalobre (2012), mostra que a formação de biofilme por *S. pneumoniae* está associada a colonização da nasofaringe, rinossinusite crônica, otite média crônica e doença obstrutiva pulmonar crônica.

Devido o biofilme ser um importante fator de colonização, disseminação e até mesmo defesa do agente patogênico, realizamos o teste com o objetivo de quantificar os isolados capazes de formarem biofilme bem como comparar com as amostras que apresentaram resistência aos antibióticos testados.

A maioria dos isolados apresentaram a capacidade de formação de biofilme com fenótipo fortemente aderente (71,2%). Correlacionando formação de biofilme e resistência ao antibiótico oxacilina, observou-se que 54,7% dos isolados que foram não susceptíveis formaram biofilme apresentando ($p = 0,0008$) estatisticamente significativo.

De acordo com Patel (2005); Smith (2005); Soto (2013) as células presentes na parte interna de um biofilme enfrentam muitas vezes condições de escassez de oxigênio e de nutrientes, o que as faz entrar na fase estacionária de crescimento e gera o fenômeno chamado de tolerância. Com isso, tais micro-organismos se tornam menos susceptíveis à ação de agentes quimioterápicos que dependem da multiplicação bacteriana, como os beta-lactâmicos. Sendo assim, torna-se evidente que existem duas subpopulações celulares fenotipicamente distintas dentro de um biofilme: uma metabolicamente ativa e outra inativa. A primeira se encontra na área mais superficial em contato com o meio externo e se apresenta suscetível aos mecanismos de ação dos antibióticos. Já a segunda, encontra-se embebida na matriz exopolimérica no interior do biofilme com taxa de divisão celular lenta.

A sorotipagem da maioria dos trabalhos, utiliza a técnica da Reação de Quellung, baseada na capacidade de o soro hiperimune específico reagir com a cápsula da bactéria em suspensão (LUCAREVSCHI et al., 2003; LO et al., 2003; BAYRAKTAR et al., 2005; NUNES et al., 2005; ASLAN et al., 2007; CHEN et al., 2007; ROCHE et al., 2007; VELASQUEZ et al., 2009). Entretanto de acordo com Pai et al., (2006) o alto custo do antissoro, a subjetividade na interpretação e as dificuldades intrínsecas da técnica da sorotipagem convencional limitam o seu uso a poucos laboratórios altamente especializados.

A técnica da multiplex PCR tem superado as dificuldades associadas a sorologia convencional, por apresentar um melhor custo benefício, existindo alguns trabalhos que utilizaram essa técnica (MORENO et al., 2005; PAI et al., 2006; DIAS et al., 2007; MORAIS et al., 2007; ANTONIO et al., 2009).

Com o objetivo de padronizar a técnica da PCR, Conkun-Ari e colaboradores (2012) comparando a técnica da PCR com a reação de Quellung encontrou resultado semelhante entre as duas técnicas.

Em nosso trabalho os 59 isolados de *S. pneumoniae* foram submetidos a PCR para identificação dos sorotipos 1, 3, 4, 5, 6A/B, 7A, 9V, 14, 18C, 19A, 19F e

23F, havendo sucesso na identificação de sorotipos capsulares de apenas nove isolados, sendo encontrados os sorotipos (9V e 19F) respectivamente 1,7% e 13,6%, que estão entre os mais freqüentes relatados por autores, no Brasil e na América Latina (DI FABIO et al., 2001; REY et al., 2002; CAMARGOS et al., 2006).

Apesar da cápsula expressa pelo pneumococo ser detectada por reação com antissoro específico, alguns isolados apresentam resultado negativo, sendo designados SpNT – *S. pneumoniae* não tipáveis, sendo importantes causadores de doenças não invasivas, como otite média e pneumonia não bacterêmica (FINLAND & BARNES 1977; HATHAWAY et al., 2004).

Estes achados suscitam a necessidade de se monitorar a frequência de isolados não tipáveis e mudanças genéticas pós-vacinação, para se detectar potenciais substituições de doença por sorotipos resultantes de “escape de vacina”, especialmente em áreas onde a colonização por isolados não tipáveis é frequente (ANDRADE et al., 2010).

Em um estudo de Rodrigues e colaboradores (2002), a coexistência de infecção viral e bacteriana foi um achado relativamente frequente, particularmente em crianças abaixo de 2 anos de idade.

Juven e colaboradores (2000) em um estudo investigando 17 agentes através de aspirado de nasofaringe, para estudo de vírus e sorologia para vírus e bactérias, detectou um ou mais agentes em 85% dos pacientes, 62% tinham evidências de infecção viral, 53% bacteriana e 30% mista. Os agentes identificados em maior frequência foram *S. pneumoniae* (37%), vírus respiratório sincicial (29%) e rinovírus (24%).

Em nossos estudos e em colaboração com o laboratório de virologia da Fundação Oswaldo Cruz-RO foi verificado que 32,69% (17/52) dos isolados apresentaram a presença do Rinovírus (valor de $p = 0,0425$, significativo). Estudos para avaliar os efeitos da infecção por rinovírus e a aderência de *S. pneumoniae* confirmou que a presença do rinovírus aumenta a quantidade de *S. pneumoniae* aderido as células, devido um aumento da expressão do receptor de superfície PAF-R (ISHIZUKA et al., 2003).

Comparando nossos resultados com relação a presença do vírus *Parainfluenza Humano* (HPIV-1), não foi constatado positividade.

Estudos recentes demonstraram que infecções na nasofaringe, causadas por infecção por vírus, altera a microflora desencadeando a formação de biofilme por *S. pneumoniae* (CHAO *et al.*, 2015).

Os resultados obtidos neste trabalho comprovam a necessidade de mais estudos para monitoramento dos agentes etiológicos causadores de infecções respiratórias agudas em crianças menores de seis anos, principalmente as amostras de *S. pneumoniae* que apresentaram altas taxas de resistências aos antibióticos e capacidade de formação de biofilme, fatores que favorecem a persistência bacteriana e que causam sérios prejuízos ao hospedeiro.

CONCLUSÃO

- Das 660 amostras 59 foram identificadas como *Streptococcus pneumoniae*.
- A maioria das amostras identificadas como *S. pneumoniae* no teste de difusão de disco, foram resistentes aos antibióticos trimetropime, oxacilina e azitromicina e apresentaram alta sensibilidade aos antibióticos vancomicina, clorofenicol, rifampicina, clindamicina e tetraciclina.
- A concentração inibitória mínima revelou que 88,1% (58/59) foram sensíveis a penicilina, 10,2% (06/59) apresentaram resistência intermediária e 1,7% (01/59) resistência plena.
- Analisando a capacidade de formação de biofilme, constatou-se que 71,2% (42/59) das amostras apresentaram fenótipo fortemente aderente.
- Após a investigação dos sorogrupos 1, 3, 4, 5, 6A/B, 7A, 9V, 14, 18C, 19A, 19F e 23F, 01 foi positiva para o sorotipo 9V e 8 para o sorotipo 19F.
- Correlacionando a colonização por *S. pneumoniae* e presença de Rinovirus, verificou-se que 32,6% (17/59) foram positivas para os dois agentes etiológicos.

REFERÊNCIAS

- ABDULLAHI, O.; KARANI, A.; TIGOI, C. C.; MUGO, D.; KUNGU, S.; WANJIRU, E.; JOMO, J.; MUSYIMI, R.; LIPSITCH, M.; SCOTT, J. A. The prevalence and risk factors for pneumococcal colonization of the nasopharynx among children in Kilifi District, Kenya. **PLoS One**, 7 (2), e30787, 2012.
- ADETIFA, I. M.; ANTONIO, M.; OKOROMAH, C. A.; EBRUKE, C.; INEM, V.; NSEKPONG, D.; BOJANG, A.; ADEGBOLA R. A. Pre-vaccination nasopharyngeal pneumococcal carriage in a Nigerian population: epidemiology and population biology. **PLoS One**, 7 (1), e30548, 2012.
- AFONSO, E.T.; MINAMISAVA, R.; BIERRENBACH, A. L.; ESCALANTE, J. J. C.; ALENCAR, A. P.; DOMINGUES, C. M. Effect of 10-Valent Pneumococcal Vaccine on Pneumonia among Children, Brazil. **Emerg Infect Dis**. Vol. 19, No. 4, 2013.
- AHMAD, O. B.; LOPEZ, A. D.; INOUE M. The decline in child mortality: a reappraisal. **Bull WHO**. 78:1175-91, 2000.
- ALBUQUERQUE, A. M. V. de. **Estudos dos Problemas Respiratórios em crianças de 0 a 12 anos no Hospital Municipal Materno Infantil no Município de Cacoal dos anos de 2002 a 2004**. Dissertação (Mestrado em Ciências da Saúde), Universidade de Brasília, 2006.
- ALLEGRUCCI, M.; HU, F. Z.; SHEN, K.; HAYES, J.; EHRLICH, G. D.; POST, J.C. and SAUER, K. Phenotypic characterization of *Streptococcus pneumoniae* biofilm development. **J Bacteriol** 188: 2325–2335, 2006.
- ANDRADE, A.L.; FRANCO, C.M.; LAMARO-CARDOSO, J.; ANDRE, M.C.; OLIVEIRA, L. L.; KIPNIS, A.; ROCHA, C.G; ANDRADE, J.G; ALVES, S.,L; PARK, I.,H; NAHM M.,H; ALMEIDA, S.G.; BRANDILEONE, M.C. Non-typeable *Streptococcus pneumoniae* carriage isolates genetically similar to invasive and carriage isolates expressing capsular type 14 in Brazilian infants. **J Infect**, 61 (4), 314-322, 2010.
- ANTONIO, M.; HAKEEM, I.; SANKAREH, K.; CHEUNG, Y. B.; ADEGBOLA, R. A. Evaluation of sequential multiplex PCR for direct detection of multiple serotypes of *Streptococcus pneumoniae* from nasopharyngeal secretions. **J Med Microbiol**, 58 (Pt 3), 296-302, 2009.
- ANTONIO, M.; ISHRAT, H.; KAESU, S.; YIN, B. C.; RICHARD, A. A. Evaluation of sequential multiplex PCR for direct detection of multiple serotypes of *Streptococcus pneumoniae* from nasopharyngeal secretions. **J. Med. Microbiol**. V. 58. P. 296-302, 2009.
- APPELBAUM, P. C. Worldwide development of antibiotic resistance in pneumococci. **Eur J Clin Microbiolog.**, 6:367, 1987.
- APPELBAUM, P. C. Antimicrobial resistance in *Streptococcus pneumoniae*: an overview. **Clin Infect Di.**, 15:77–83, 1992.

ARTAN, M. O.; BAYKAN, Z.; ARTAN, C. Antimicrobial Susceptibility of streptococcus pneumoniae in the oropharynx of healthy pre school children identification of risk factors. **Jpn. J. Infect. Dis.**, vol 61, p. 302-303, 2008.

ASLAN, G. EMEKAS, G.; BAYER, M.; SERIN, M. S.; KUYUCU, N.; KANIK, A. Serotype distribution of Streptococcus pneumoniae strains in the nasopharynx of healthy Turkish children. **Indian J. Med Res.**, v. 125, n. 4. p. 528-587, 2007.

AUSTRIAN, R. Some observations on the pneumococcus and on the current status of pneumococcal disease and its prevention. **Reviews of infectious diseases**, 3 Suppl, S1-17, 1981.

AUSTRIAN, R. A. Pneumococcus: the first one hundred years. **Rev Infect Dis**, v.3, p.183-9, 1981.

AUSTRIAN R. A. Pneumococcal infections. In: Germanier R. ed. Bacterial vaccines. **New York: Academic Press.**, Inc. p. 257-288, 1984.

AUSTRIAN R. Some aspects of the pneumococcal carrier state. **J Antimicrob Chemother.** 18 Suppl A:35-45, 1986.

AUSTRIAN, R. Confronting drug-resistant pneumococci. **Ann Intern Med.**,121:807-809, 1994.

BAE, S.; YU, J. Y.; LEE, K.; LEE, S.; PARK, B.; KANG, Y. Nasal colonization by four potential respiratory bacteria in healthy children attending kindergarten or elementary school in Seoul, Korea. **J Med Microbiol.**, 61 (Pt 5), 678-685, 2012.

BAKER, MG.; BARNARD, L.T.; KVALSVIG, V.A.; AYESHA, Z. J.; KEALL, M. N.; WALL, T.; HOWDEN P. C. Increasing incidence of serious infectious diseases and inequalities in New Zealand: a national epidemiological study. **The Lancet**, Vol. 379,p:1112 - 1119, 2012.

BARROS, M. M. A. **Poluição Atmosférica e Hospitalizações por Doenças Respiratórias em Crianças Menores de 12 anos no Município de Porto Velho-RO, Amazônia Ocidental**, 2011. Dissertação (Mestrado em Desenvolvimento regional e Meio Ambiente) Universidade Federal de Rondônia.

BAYRAKTAR, M.; DURMAZ, B.; KALCIOGLU, M.; DURMAZ, R.; CIZMECI, Z.; AND AKTAS, E. Nasopharyngeal carriage, antimicrobial susceptibility, serotype distribution and clonal relatedness of *Streptococcus pneumoniae* in healthy children in Malatya, Turkey. **Int. J. Antimicrob. Agents**; v. 26, n. 3, p. 241-246, 2005.

BEDRAN, MARIA BEATRIZ MARCOS & CAMARGOS, PAULO AUGUSTO MOREIRA. Espectro de sensibilidade do *Streptococcus pneumonie* a penicilina e a outros antimicrobianos: mecanismos de resistência, epidemiologia e aspectos clínicos. **Revista de Pediatria do Ceára**, 2002.

BELLOS, A.; MULHOLLAND, K.; O'BRIEN, K. O; QAZI, AS.; GAYER, M.; CHECCHI, F. The burden acute respiratory infections in crisis-affected populations: a systematic review. **Confl Health**, v 4, p. 3, 2010.

BENGUIGUI, Y. As infecções respiratórias agudas na infância como problema de saúde pública. **Bol Pneumol Sanit.**, 10(1):13-22, 2002.

BENGUIGUI, Y. Acute respiratory infections control in the context of the IMCI strategy in the Americas. **Rev Bras Saúde Matern Infant.** 3(1):25-36, 2003.

BERGERON, Y.; OUELLET, N.; DESLAURIERS, A. M.; SIMARD, M.; OLIVIER, M.; BERGERON, M. G. Cytokine kinetics and other host factors in response to pneumococcal pulmonary infection in mice. **Infect Immun**, 66:912-22. 1998.

BERGMANN, C.; CHI, F.; RASHID, S.; HAKENBECK. Mechanisms for penicillin resistance in *Streptococcus pneumoniae*: penicillin-binding proteins, gene transfer, and cell wall metabolism. *In* E.I.Tuomanen, T.J. Mitchell, D. A, 2004.

BERGEY, D. H. Bergey's Manual of Systematic Bacteriology. Vol. 3. New York: **Springer**, 2001.

BILLAL, D. S.; HOTOMI, M.; SUZUMOTO, M.; YAMAUCHI, K.; ARAI, J.; KATSURAHARA, T.; MORIYAMA, S.; FUJIHARA, K.; YAMANAKA, N. Determination of pneumococcal serotypes/genotypes in nasopharyngeal secretions of otitis media children by multiplex PCR. **Eur J Pediatr**, 167 (4), 401-407, 2008.

BOGAERT, D. R.; DE GROOT, E. P. HERMANS, P. *Streptococcus pneumoniae* colonisation: the key to pneumococcal disease. **Lancet Infect Dis.** 4(3):144-54, 2004.

BOUSKRAOUI, M.; SORAA, N.; ZAHLANE, K.; ARSALANE, L.; DOIT, C.; MARIANI, P.; BINGEN, E. Study of nasopharyngeal colonization by *Streptococcus pneumoniae* and its antibiotics resistance in healthy children less than 2 years of age in the Marrakech region (Morocco). **Arch Pediatr**, 18 (12), 1265-1270, 2011.

BUDHANI, R.K.; AND STRUTHERS, J.K. The use of Sorbarod biofilms to study the antimicrobial susceptibility of a strain of *Streptococcus pneumoniae*. **J Antimicrob Chemother.**, 40: 601–602, 1997.

BRANDILEONE, M. C. C.; CASAGRANDE, S. T.; GUERRA, M. L. S.; ZANELLA R. C.; ANDRADE, A. L. S. S.; DI FABIO J. L. Increase in numbers of-lactam-resistant invasive *Streptococcus pneumoniae* in Brazil and the impact of conjugate vaccine coverage. **Journal of Medical Microbiology.**, 55: 567-574, 2006.

BRASIL. Ministério da Saúde. Portaria nº- 3.318, de 28 de outubro de 2010. Dispõe sobre a organização das ações de Vigilância Epidemiológica, sobre o Programa Nacional de Imunizações, estabelece normas relativas à notificação compulsória de doenças. 2010

BRASIL. Ministério da Saúde. Departamento de Informática do SUS. Sistema de Informação Hospitalar/ SIH. Brasília, DF, 2012.

_____. Ministério da Saúde. Departamento de Informática do SUS. Sistema de Informação Hospitalar/ SIH. Brasília, DF, 2013.

BREIMAN, R. F.; SPIKA, J. S.; NAVARRO, V. J.; DARDEN, P. M.; DARBY C. P.; Pneumococcal bacteremia in Charleston County, South Carolina: a decade later. **Arch Intern Med.**,150:1401–5, 1990.

BRINCK, L. F.; BEREZIN, E. Impact of pneumococcal conjugate vaccine on the prevention of invasive pneumococcal diseases. **J Pediatr.**, v.82, n.3, p.67-74, 2006.

BRUGGER, S. D.; HATHAWAY, L. J.; MUHLEMANN, K. Detection of *Streptococcus pneumoniae* strain cocolonization in the nasopharynx. **J Clin Microbiol**, 47 (6), 1750-1756, 2009.

BRUGGER S.; FREY P.; AEBI, S.; HINDS, J.; MUHLEMANN, K. Multiple colonization with *S. pneumoniae* before and after introduction of the seven-valent conjugated pneumococcal polysaccharide vaccine. **Plos One**, v. 5, n. 7, p. 1-8, jul. 2010.

BUDHANI, R.K. and STRUTHERS, J.K. The use of Sorbarod biofilms to study the antimicrobial susceptibility of a strain of *Streptococcus pneumoniae*. **J Antimicrob Chemother.**, 40: 601–602, 1997.

CDC 2000. Preventing pneumococcal disease among infants and young children. In Morb Mortal Wkly Rep, Centers for Disease Control & Prevention, Recommendations of the Advisory Committee on Immunization Practices p. 1-35.

CDC. Direct and indirect effects of routine vaccination of children with 7-valent pneumococcal conjugate vaccine on incidence of invasive pneumococcal disease--united states, 1998-2003. **MMWR Morb. Mortal. Wkly Rep.**, v. 54, n. 36, sep 16, p. 893-897, 2005.

CENTER FOR DISEASES CONTROL AND PREVENTION-CDC. Invasive pneumococcal disease in children 5 years after conjugate vaccine introduction--eight states, 1998-2005. **MMWR**, v. 57, p.144-148, 2008.

CAMARGOS, P.; FISCHER, G. B.; MOCELIN, H.; DIAS, C.; RUVINSKY, R. Penicillin resistance and serotyping of *Streptococcus pneumoniae* in Latin America. **Pediatr. Respir. Rev.**, v. 7, n. 3. P. 209-214, 2006.

CARDOZO, D. M.; NASCIMENTO-CARVALHO, C. M.; SOUZA, F. R; SILVA N. M. Nasopharyngeal colonization and penicillin resistance among pneumococcal strains: a worldwide 2004 update. **Braz J Infect Dis.**, v. 10. N. 4 p. 293-303. 2006.

CAMILLI, R.; PANTOSTI, A. and BALDASSARRI, L. Contribution of serotype and genetic background to biofilm formation by *Streptococcus pneumoniae*. **Eur J Clin Microbiol Infect Dis.**, 30: 97–102, 2011.

CAMPBELL, J. R G. D; SILBERMAN, R. Drug resistant *Streptococcus pneumoniae*. **Clin Infect Dis.**, 26:1188-1195, 1998.

CHAO, Y.; MARKS, L. R.; PETTIGREW, M. M.; HAKANSSON, A. P. *Streptococcus pneumoniae* biofilm formation and dispersion during colonization and disease.

Frontiers in Cellular and Infection Microbiology, Volume 4, Article 194, January 2015.

COATES, H.; THORNTON, R.; LANGLANDS, J.; FILION, P.; KEIL, A. D.; VIJAYASEKARAN, S. and RICHMOND, P. The role of chronic infection in children with otitis media with effusion: evidence for intracellular persistence of bacteria. **Otolaryngol Head Neck Surg.**, 138: 778–781, 2008.

COSKUN-ARI, F. F.; GULDEMIR, D.; DURMAZ, R. One-Step Multiplex PCR Assay for Detecting *Streptococcus pneumoniae* Serogroups/Types Covered by 13-Valent Pneumococcal Conjugate Vaccine (PCV13). **PLoS ONE** 7(12): e50406. doi:10.1371/journal.pone.0050406, 2012.

CHEN, C.; HUANG, Y.; SU, L.; LIN, T. Nasal carriage of *Streptococcus pneumoniae* in healthy children and adults in northern Taiwan. **Diag. Microbiol. Infect. Dis.**, v. 59, n. 3. P 265-269, 2007.

CHIEN, Y. W.; VIDAL, J. E.; GRIJALVA, C. G.; BOZIO, C.; EDWARDS, K. M.; WILLIAMS, J. V.; GRIFFIN, M. R.; VERASTEGUI, H.; HARTINGER, S. M.; GIL, A. I.; LANATA, C. F.; KLUGMAN, K. P. Density Interactions between *Streptococcus pneumoniae*, *Haemophilus influenzae* and *Staphylococcus aureus* in the Nasopharynx of Young Peruvian Children. **Pediatr Infect Dis J.**, 2012.

CHIU, S. S.; HO, P. L.; CHOE, F. K. H.; YUEN K. Y.; LAU Y. L. Nasopharyngeal carriage of antimicrobial-resistant *Streptococcus pneumoniae* among children attending 79 kindergartens and day care centers in Hong Kong. **Antimicrob. Agents Chemother.**, v. 45, n. 10, p. 2765-2770, 2001.

CUNDELL, D. R.; WEISSER J. N.; SHEN, J.; YOUNG, A.; TUOMANEN E. I. Relationship colonial morphology and adherence of *Streptococcus pneumoniae*. **Infect. Immun.** 63:757-761, 1995.

DAGAN, R.; LEIBOVITZ, E.; GREENBERG, D.; YAGUPSKY, P.; FLISS, D. M.; LEIBERMAN, A. Dynamics of pneumococcal nasopharyngeal colonization during the first days of antibiotic treatment in pediatric patients. **Pediatr Infect Dis J.**, 17:880-5, 1998.

DE SOUSA MARQUES, H. H.; YAMAMOTO, M.; SAKANE, P. T.; CAIAFFA-FILHO, H. H.; FIGUEIREDO MENDES C. M. Relatively penicillin-resistant pneumococcal meningitis in a Brazilian infant. **Pediatr Infect Dis J.**, 7:433–4, 1988.

DIAS, C. A.; TEIXEIRA, L. M.; CARVALHO, M. G.; BEALL, B. Sequential multiplex PCR for determining capsular serotypes of pneumococci recovered from Brazilian children. **J. Med. Microbiol.**, v. 56, n. 9, p. 1185-1188, 2007.

DI FABIO, J. L.; CASTANEDA, E.; AGUDELO, C. I.; DE LA HOZ, F.; HORTAL, M.; CAMOU, T.; ECHANIZ-AVILE´ S, G.; NOEMI, M.; BARAJAS, C. Evolution of *Streptococcus pneumoniae* serotypes and penicillin susceptibility in Latin America, Sireva-Vigia Group, 1993 to 1999. The PAHO Sireva-Vigia Study Group. **Pediatr Infect Dis J.**, 20:959–967, 2001.

DOMENECH, M.; GARCÍA, E. and MOSCOSO, M. Versatility of the capsular genes during biofilm formation by *Streptococcus pneumoniae*. **Environ Microbiol** 11: 2542–2555, 2009.

DONKOR, E. S. Understanding the pneumococcus: transmission and evolution. *Front. Cell. Infect. Microbiol.*, v3, p. 1-5, mar. 2013.

DONLAN, R.M.; PIEDE, J. A.; HEYES, C. D.; SANII, L.; MURGA, R.; EDMONDS, P. Model system for growing and quantifying *Streptococcus pneumoniae* biofilms in situ and in real time. **Appl Environ Microbiol.**, 70: 4980–4988., 2004.

ERCIBENGOA, M.; AROSTEGI, N.; MARIMON, J. M; ALONSO, M.; PEREZ-TRALLERO E. Dynamics of pneumococcal nasopharyngeal carriage in healthy children attending a day care center in northern Spain. Influence of detection techniques on the results. **BMC Infect Dis**, 12, 69, 2012.

FACANHA, M. C.; PINHEIRO, A. C. Doenças respiratórias agudas em serviços de saúde entre 1996 e 2001, Fortaleza, CE. **Rev. Saúde Pública.**, 38 (3):346-350, 2004.

FAUST, K.; DEMMERT, M.; BENDIKS, M.; GOPEL, W.; HERTING, E.; HARTEL, C. Intrapartum colonization with *Streptococcus pneumoniae*, early-onset sepsis and def, **Pub Med.**, Mar; 285(3):599-604, 2012.

FELMINGHAM, D.; CANTON, R.; JENKIS, S. G. Regional trends in beta-lactam, macrolide, fluoroquinolone and telithromycin resistance among *Streptococcus pneumoniae* isolates 2001-2004. **J Infect.**, v. 55, n. 2, p. 111-8, 2007

FERRANDIZ, M. J.; FENOLL, A.; LIÑARES, J.; LA CAMPA, A. Horizontal Transfer of parC and gyrA in fluoroquinolone-Resistant Clinical Isolates of *Streptococcus pneumoniae*. **Antimicrobial Agents And Chemotherapy**, v. 44, n. 4, p. 840–847. Abr. 2000.

FERREIRA, L.L.; CARVALHO, E. S.; BEREZIN, E. M.; BRANDILEONE, M. C. Nasopharyngeal colonization and antimicrobial resistance of *Streptococcus pneumoniae* isolated from children with acute rhinopharyngitis. **J Pediatr** (Rio J). 77:227-34, 2001.

FLEMMING, H. C.; and WINGENDER, J. The biofilm matrix. **Nat Rev Microbiol.**, 8: 623–633, 2010.

FINLAND, M.; BARNES, M. W. Changes in occurrence of capsular serotypes of *Streptococcus pneumoniae* at Boston City Hospital during selected years between 1935 and 1974. **J Clin Microbiol.**, 5 (2), 154-166, 1997.

FISCHER, G. B.; TEPPER, A.; COLOM, A.J. Acute viral bronchiolitis and its sequelae in developing countries. **Pediatr Respir Rev.**,3(4):298-302, 2002.

FRANCIS, J. P.; RICHIMOND, P. C. Maternal antibodies to pneumolysin but not to pneumococcal surface protein a delay early pneumococcal carriage in highrisk papua new guinean infants. **Clin. Vaccine. Immunol**, v.16, p. 1633–1638, 2009.

FRANCO, C. M.; ANDRADE, A. L.; ANDRADE, J. G.; ALMEIDA E SILVA, S.; OLIVEIRA, C.R.; PIMENTA, F. C.; LAMARO-CARDOSO, J.; BRANDAO, A. P.; ALMEIDA, S. C.; CALIX, J.J.; NAHM, M. H.; BRANDILEONE, M. C. Survey of nonsusceptible nasopharyngeal *Streptococcus pneumoniae* isolates in children attending day-care centers in Brazil. **Pediatr Infect Dis J**, 29 (1), 77-79, 2010.

FREDERICKSEN, B.; HEMRICHSSEN, J. Throat carriage of *Streptococcus pneumoniae* and *Streptococcus pyogenes* among infants and children in Lambia. **J Trop Pediatr.**, 1988;34:114-7.

FRISCH, A. W.; PRICE, A. E.; MYERS, G. B. Development of sulfadiazine resistance, transmission by cross infection and persistence in carriers. **Ann Intern Med** 1943; 18:271-278, 1943.

GEID, L. T.; ROSSO, R.; CASARIN, R. G.; FRÉU, RODRIGO, G.; ANDRADE, G. P.; NUNES, M. L. Iniquidade na hospitalização por pneumonia: coorte de nascidos vivos. **bj. nurs.b** 6(3), 2007.

GHAFFAR, F.; FRIEDLAND, I. R. E.; MCCracken, J. R. Dynamics of nasopharyngeal colonization by *Streptococcus pneumoniae*. **Pediatr Infect Dis J**, 18:638-46, 1999.

GLADSTONE. R. A.; JEFFERIES, J. M.; FAUST, S. N.; CLARKE, S. C. Continued control of pneumococcal disease in the UK - the impact of vaccination. **J Med Microbiol**, 60 (Pt 1), 1-8, 2011.

GOERES, D. M.; LOETTERLE, L. R.; HAMILTON, M.A.; MURGA, R.; KIRBY, D.W.; AND DONLAN, R.M. Statistical assessment of a laboratory method for growing biofilms. **Microbiolog.**, 151: 757–762, 2005.

GRATTEN, M.; MANNING, K.; DIXON, J.; MOREY, F.; TORZILLO, P.; HANNA, J.; ERLICH, J.; ASCHE, V.; RILEY, I. Upper airway carriage by *Haemophilus influenzae* and *Streptococcus pneumoniae* in Australian aboriginal children hospitalised with acute lower respiratory infection. Southeast Asian. **J Trop Med Public Health**, 25 (1), 123-131, 1994.

GRAY, B. M.; CONVERSE, G. M.; DILLON, H. C. JR. Epidemiologic studies of *Streptococcus pneumoniae* in infants: acquisition, carriage, and infection during the first 24 months of life. **J Infect Dis**, 142 (6), 923-933, 1980.

GRIVEA, I. N.; TSANTOULI, A. G.; MICHOUA, A. N.; SYROGIANNOPOULOS, G. A. Dynamics of *Streptococcus pneumoniae* nasopharyngeal carriage with high heptavalent pneumococcal conjugate vaccine coverage in Central Greece. **Vaccine**, 29 (48), 8882-8887, 2011.

HAKANSSON, A.; KIDD, A.; WADEL, G.; SABHARWAL, H.; SVANBORG, C. Adenovirus infection enhances in vitro adherence of *Streptococcus pneumoniae*. **Infect. Immun.** 62:2707-2714, 1994.

HAKENBECK, R.; ELLERBROK, H.; BRISE, T.; HANDWERG, S. Penicillin-Binding Proteins of Penicillin-Susceptible and Resistant *Pneumococci*: Immunological Relatedness of Altered Proteins and Changes in Peptides Carrying the 3-Lactam Binding Site. **Antimicrobial Agents And Chemotherapy**, v. 30, n. 4, p. 553-558. Oct. 1986

HAMER, D. H. EGAR. J.; ESTRELLA, B.; WILLIN, M.; JEFFREY, G.; SEMPÉRTEGUI, F. Assessment of the Banax Now *Streptococcus pneumoniae* Urinary Antigen Test in children with Nasopharyngeal *Pneumococcal* Carriage. **Clin. Infect. Dis.** v. 34, n. 7, p. 1025-1028, 2002.

HAMMERSCHMIDT, S.; TALAY, S. R.; BRANDTZAEG, P.; CHHATWAL, G. S. SpsA, a novel pneumococcal surface protein with specific binding to secretory immunoglobulin A and secretory component. **Mol Microbiol.**, 25: 1113–24, 1997.

HARE, K. M.; SINGLETON, R. J.; GRIMWOOD, K.; VALERY, P. C.; CHENG, A. C.; MORRIS, P. S.; LEACH, A. J.; SMITH-VAUGHAN, H.; CHATFIELD, M.; REDDING, G.; REASONOVER, A. L.; MCCALLUM, G. B.; CHIKOYAK, L.; MCDONALD, M. I.; BROWN, N.; TORZILLO, P. J. & CHANG, A. B. Longitudinal nasopharyngeal carriage and antibiotic resistance of respiratory bacteria in indigenous Australian and Alaska native children with bronchiectasis. **PLoS One**, v.8, n.8, p. 1-9, Aug. 2013.

HAUSDORFF, W. P.; FEIKIN, D. R. Epidemiological differences among pneumococcal serotypes. **Lancet Infect. Dis.**, v.5, n.2, p.83-93, 2005.

HALL-STOODLEY, L.; and STOODLEY, P. Biofilm formation and dispersal and the transmission of human pathogens. **Trends Microbiol.**, 13:7–10, 2006.

HALL-STOODLEY & STOODLEY P. Evolving concepts in biofilm infections. **Cellular Microbiology** ., 11(7), p. 1034-1043, 2009.

HATHAWAY, L. J.; STUTZMANN, MEIER P.; BATTIG, P.; AEBI, S.; MUHLEMANN, K. A homologue of *aliB* is found in the capsule region of nonencapsulated *Streptococcus pneumoniae*. **J Bacteriol.**, 186 (12), 3721-3729, 2004.

HEFRON R. *Pneumonia: with special reference to Pneumococcus lobar pneumonia*. Cambridge, MA: **Harvard University Press**, 1979.

HILL, P. C.; AKISANYA, A.; SANKAREH, K.; CHEUNG, Y. B.; SAAKA, M.; LAHAI, G.; GREENWOOD, B. M.; ADEGBOLA R. A. Nasopharyngeal carriage of *Streptococcus pneumoniae* in Gambian villagers. **Clin Infect Dis.**, 43 (6), 673-679, 2006.

HILL, P. C.; CHEUNG, Y.B.; AKISANYA, A.; SANKAREH, K.; CHEUNG, Y. B.; SAAKA, M.; LAHAI, G.; GREENWOOD, B. M.; ADEGBOLA R. A. Nasopharyngeal carriage of *Streptococcus pneumoniae* in Gambian infants: a longitudinal study. **Clin. Infect. Dis.**, v. 46, n. 6, p. 807-814, Mar. 2008.

HIRST, Robert *et al.* The role of pneumolysin in pneumococcal pneumonia and meningitis. **Clinical and experimental immunology**. n.138, p.195-201, nov.2004. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC1809205/>>. Acesso em: 10 de dezembro de 2014.

HOA, M.; TOMOVIC, S.; NISTICO, L.; HALL-STOODLEY, L.; STOODLEY, P.; SACHDEVA, L. Identification of adenoid biofilms with middle ear pathogens in otitis-prone children utilizing SEM and FISH. **Int J Pediatr Otorhinolaryngol** 73:1242–1248, 2009.

HSU, K. K.; RIFAS-SHIMAN, S. L.; SHEA, K. M.; LEE, G. M.; LAKOMA, M.; PELTON, S. I.; FINKESLSTEIN, J. A.; HUANG, S. S. Do community - level predictors of pneumococcal carriage continue to play a role in the conjugate vaccine era? **Epidemiol Infect**, 142(2), 2014.

HUSSAIN, M.; MELEGARO, A., et al. A longitudinal household study of *S. pneumoniae* nasopharyngeal carriage in a UK setting. **Epidemiol. Infect.**, v. 133, n. 5 p.891-898, oct. 2005.

ISHIZUKA, S.; MUTSUO, Y.; SUZUK, T.; TAKAHASHI, H.; IDA, S.; SASAKI, T.; INOUE, D.; SEKIZAWA, K.; NISHIMURA, H.; AND SASAKI, H. Effects of Rhinovirus Infection on the Adherence of *Streptococcus pneumoniae* to Cultured Human Airway Epithelial Cells. **The Journal of Infectious Diseases**., 188:1928–39, 2003.

JACOBS, M. R.; KOORNHOF, H. J.; ROBINS-BROWNE, R. M.; STEVENSON C. M.; VERMAAK Z. A. Emergence of multiply resistant pneumococci. **N Engl J Med.**, 299:735-40, 1978.

JENSEN, P. O.; GIVSKOV, M.; BJARNSHOLT, T.; and MOSER, C. The immune system vs. *Pseudomonas aeruginosa* biofilms. **FEMS Immunol Med Microbiol.**, 59: 292–305, 2010.

JEDRZEJAS, MARK. Pneumococcal Virulence Factors: structure and function. **Microbiology and Molecular Biology Reviews**. n. 65, p.187-207, jun.2001.

JUVEN, T.; MERTSOLA, J.; WARIS, M. Etiology of community-acquired pneumonia in 254 hospitalized children. **Pediatr Infect Dis J.**, 19:293–8, 2000.

KADIOGLU, A.; WEISER, J. N.; PATON, J. C.; ANDREW P. W. The role of *Streptococcus pneumoniae* virulence factors in host respiratory colonization and disease. **Nat Rev Microbiol.**, v. 6, n. 4, p. 288-301, Apr 2008.

KASNOWSKI, M. C.; MANTILLA, S. P. S.; OLIVEIRA, L.T.A.; FRANCO, R. M. Formação de Biofilme na Indústria de Alimentos e Métodos de Avaliação de Superfícies; **Revista científica eletrônica de medicina veterinária**; Ano VIII, Número 15; Julho de 2010.

KERTESZ D.A.; DI FABIO J.L.; DE CUNTO.; BRANDILEONE, M. C. Invasive *Streptococcus pneumoniae* infection in Latin American children: results of the Pan

American Health Organization Surveillance Study. **Clin Infect Dis.**, 26:1355–61, 1998

KLUGMAN K. P. The successful clone: the vector of dissemination of resistance in *Streptococcus pneumoniae*. **J Antimicrob Chemother**, 50 (Supl. S2): 1-5, 2002.

KONEMAN, E. W.; ALLEN, S. D.; JANDA, W. M. Diagnóstico microbiológico: texto e atlas colorido. 6. ed. São Paulo, **Panamericana**, 1488 p. 2008.

KORONA-GLOWNIAK, I.; MALM, A. Characteristics of *Streptococcus pneumoniae* Strains Colonizing Upper Respiratory Tract of Healthy Preschool Children in Poland. **Sci World J.**, 2012.

LAMARO-CARDOSO, J.; DE LEMOS, A. P.; CARVALHO, M. D. A. G.; PIMENTA, F. C.; ROUNDTREE, A.; MOTTA, L.; VIEIRA, M. A.; SGAMBATTI, S.; THORN, L. K.; PESSOA-JUNIOR, V.; MINAMISAVA, R.; HARRISON, L. H.; BEALL B. W.; BRANDILEONE, M. C.; ANDRADE A. L. Molecular epidemiological investigation to determine the source of a fatal case of serotype 22F pneumococcal meningitis. **J Med Microbiol.**, 61 (Pt 5), 686-692, 2012.

LAVAL, C. B.; ANDRADE, A. L.; PIMENTA, F. C.; ANDRADE, J. G.; OLIVEIRA, R. M.; SILVA, A. Serotypes of carriage and invasive isolates of *Streptococcus pneumoniae* in Brazilian children in the era of pneumococcal vaccines. **Clin Microbiol Infect.**, 12:50-5, 2006.

LEIBERMAM, A.; DAGAN, R.; LEIBOVITZ, E.; YAGUPSKY, P. E.; FLISS, D.M. The bacteriology of the nasopharynx in childhood. **Int J Pediatr Otorhinolaryngol.** 49 Supl 1:S151-3, 1999.

LEWIS, K. Multidrug tolerance of biofilms and persister cells. **Curr Top Microbiol Immunol.**, 322: 107–131, 2008.

LLOYD-EVANS, N.; O'DEMPSEY, T. J.; BALDEH, I.; SECKA, O.; DEMBA, E.; TODD, J. E. Nasopharyngeal carriage of pneumococci in Gambian children and their families. **Pediatr Infect Dis J.** 15:866-71, 1996.

LO, W. T.; WANG, C. C.; YU, C. M.; CHU, M. L. Rate of nasopharyngeal carriage, antimicrobial resistance and serotype of *Streptococcus pneumoniae* among children in northern Taiwan. **J Microbiol Immunol Infect.**, 36:175-81, 2003.

LÓPEZ, RUBENS. *Streptococcus pneumoniae* and its bacteriophages: one long argument. **International Microbiology**. n. 7, p. 163-171, 2004. Disponível em: <<http://www.im.microbios.org/0703/0703163.pdf>>. Acesso em: 10 dezembro de 2014.

LUCAREVSCHI, B. R.; BALDACCI, E.R.; BRICKS, L.F.; BERTOLI, C.J.; TEIXEIRA, L.M.; MENDES, C..M.; OPLUSTIL, C. Oropharyngeal carriage of *Streptococcus pneumoniae* by children attending day care centers in Taubate, SP: correlation between serotypes and the conjugated heptavalent pneumococcal vaccine. **J Pediatr (Rio J)**, 79 (3), 215-220, 2003.

MALFROOT, A. et al. A cross-sectional survey of the prevalence of *Streptococcus pneumoniae* nasopharyngeal carriage in Belgian infants attending day care centres. **Clin Microbiol. Infect.**, p. 10, n. 9, p. 797-803, 2004.

MANTESE, O. C. Pneumococo resistente à penicilina-implicações práticas. **J. Pediatria**, 75 (Supl 1):74-90, 1999.

MANTESE, O. C.; PAULA, A.; MORAES, A. B.; MOREIRA, T. A.; GUERRA, M. L.; BRANDILEONE, M.C. Prevalência de sorotipos e resistência antimicrobiana de cepas invasivas do *Streptococcus pneumoniae*. **J Pediatr (Rio-RJ)**, 79:537-42, 2003.

MANTESE O. C, DE PAULA A, ALMEIDA V. V, DE AGUIAR P. A, WOLKERS P. C, ALVARES J. R. Prevalence of serotypes and antimicrobial resistance of invasive strains of pneumococcus in children: analysis of 9 years. **Jornal de Pediatria**. Porto Alegre. v. 85, n.6, p.495-502, nov./dec. 2009.

MARCHESE, A.; GUALCO, L.; COCHETTI, I.; MONTANARI, M. P.; SPECIALE, A.; M; MUSUMECI, S. R.; VARALDO, P. E.; NICOLETTI, G.; SCHITO, G. C. Antibiotic susceptibility and serotype distribution in *Streptococcus pneumoniae* circulating in Italy: results of the SEMPRES surveillance study (2000-2002). **Int J Antimicrob Agents.**, 26:138-145, 2005.

MASUDA, K.; MASUDA, R.; NISHI, J.; TOKUDA, K.; YOSHINAGA, M.; MIYATA, K. Incidences of nasopharyngeal colonization of respiratory bacterial pathogens in Japanese children attending day-care centers. **Pediatr Int.** 44: 376-80, 2002.

MATSUMOTO, A.; HOSOYA, M.; KAWASAKI, Y.; KATAYOSE, M.; KATO K.; SUZUKI H. The Emergence of Drug-Resistant *Streptococcus pneumoniae* and Host Risk Factors for Carriage of Drug-Resistant Genes in Northeastern Japan. **Jpn. J. Infect. Dis.** V. 60, n. 1, p. 10-13, 2007.

MENEZES, A.P.O; CAMPOS, L. C; SANTOS, M. S; ZEVEDO, J.; DOS SANTOS, P. C.; CARVALHO, M. G.; BEALL, B. W.; MARINS, S. W.; SALGADO, K.; REIS, M. G.; KO, AL.; REIS, J. N. Serotype distribution and antimicrobial resistance of *Streptococcus pneumoniae* prior to introduction of the 10-valent pneumococcal conjugate vaccine in Brazil, 2000-2007. **Vaccine**, 29(6): p.1139-44, 2011.

MINISTÉRIO DA SAÚDE (BR). Assistência integral à saúde da criança: ações básicas. Brasília (DF): **Ministério da Saúde**; 1984.

Ministério da Saúde (BR). Informações de saúde epidemiológicas e morbidade. Indicadores de Morbidade Hospitalar do SUS por Internação. 2010. Disponível em: <http://www.datasus.gov.br>.

Ministério da Saúde (BR). Secretaria de Vigilância em Saúde. Guia de Vigilância Epidemiológica 7ª edição. Caderno 12 – Doenças. Meningites. Departamento de Vigilância Epidemiológica – Brasília (DF); 2010.

Ministério da Saúde Programa Nacional de Imunização. http://portalsaude.saude.gov.br/portalsaude/arquivos/pdf/2012/Set/23/livro_40anos_pni_web.pdf. Acessado em 10_12_2014.

MONACO, M.; CAMILLI, R.; D'AMBROSIO, F.; DEL GROSSO, M.; PANTOSTI, A.; Evolution of erythromycin resistance in *Streptococcus pneumoniae* in Italy. **J Antimicrob Chemother**, 55:256-259, 2005.

MONTEROS, L. E. E.; Jiménez-Rojas, V.; Aguilar-Ituarte, F.; Cashat-Cruz, M.; Reyes-López, A.; Rodríguez-Suárez, R. *Streptococcus pneumoniae* isolates in healthy children attending day-care centers in 1 states in México. **Salud Publica Mex.**, v. 49, n. 4, p. 249-255, 2007.

MONTGOMERY, J. M.; LEHMANN, D.; SMITH, T.; MICHAEL, A.; JOSEPH, B.; LUPIWA, T. Bacterial colonization of the upper respiratory tract and its association with acute lower respiratory tract infections in highland of Papua New Guinea. **Rev Infect Dis.**, 12(suppl 8):S1006-16, 1990.

MORAIS, L.; CARVALHO, M. G.; ROCA, A.; FLANNERY, B.; MANDOMANDO, I.; SORIANO-GABARRÓ, M.; SIGAUQUE, B. sequential multiplex pcr for identifying pneumococcal capsular serotypes vfrom vsouth saharan african clinical isolates. *j. med microbiol.*, v. 56, n. 9. p. 1181-1184, 2007.

MORENO, J.; HERNÁNDEZ, E.; SANABRIA, O.; CASATANEDA, E. detection and serotyping of *Streptococcus pneumoniae* from nasopharynx samples by pcr based m ultiplex assay. *j. clin. microbiol.*, v. 43, n. 12. p. 6152-6154, 2005.

MOSCOSO, M.; GARCÍA, E.; and LÓPEZ, R. Biofilm formation by *Streptococcus pneumoniae*: role of choline, extracellular DNA, and capsular polysaccharide in microbial accretion. **J Bacteriol.**, 188: 7785–7795, 2006.

NEVES, F. P.; PINTO, T. C.; CORREA, M. A. Nasopharyngeal carriage serotype distribution and antimicrobial resistance of *Streptococcus pneumoniae* among children from Brail before introduction of the 10-valent conjugate vaccine. **BMC Infectious Disease**.13(318): p. 1-7, 2013.

NISTICO, L.; KREFT, R.; GIESEKE, A.; COTICCHIA, J. M.; BURROWS, A.; KHAMPANG, P. Adenoid reservoir for pathogenic biofilm bacteria. **J Clin Microbiol.**, 49: 1411–1420, 2011.

NORMARK, B. H.; & NORMARK, S. Evolution and spread of antibiotic resistense. **Journal of internal Medicine**, 252; 91-106, 2002.

NORMARK, BIRGITTA HENRIQUES.; NORMARK, STAFFAN. Commensal pathogens, with a focus on *Streptococcus pneumoniae*, and interactions with the human host. **Experimental Cell Research**. n. 316, p.1408-1414, may. 2010. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/20227406>>. Acesso em: 15 de novembro de 2014.

NOVALES, M. G.; SNATOS, F. S.; GALLARDO, H. G.; MIRANDA, B. L.; AVILES, G. E.; BARAJAS, M. N. *Streptococcus pneumoniae*: low frequency of penicillin resistance and high resistance to trimetoprim-sulfamethoxazole in nasopharyngeal isolates from children in a rural area in Mexico. **Arch Med Rev.**, 28:559-63, 1997.

NOVAK, R. TUOMANEN E. Pathogenesis of pneumococcal pneumonia. **Semin Respir Infect.**, 14:209-17, 1999.

NUNES, S.; SÁ-LEÃO R.; CARRICO, J.; ALVES, C. R.; MATO, R.; AVÔ, A. B.; SALDANHA, J.; ALMEIDA, J. S.; SANCHES, I. S.; LENCASTRE, H. Trends in drug resistance, serotypes, and molecular types of *Streptococcus pneumoniae* a summary of 4 years of annual surveillance. *J. Clin. Microbiol.*, v. 43, n. 3, p. 1285-1293, 2005.

OZDEMIR, H.; Çiftçi, E.; Durmaz, R.; Güriz, H.; Aysev, A. D.; Karbuz, A.; Gökdemir, R.; Acar, B.; Nar-Ötğün, S.; Ertek, M.; Serdal Kenan Köse, S. K.; İnce, E. Nasopharyngeal carriage of *Streptococcus pneumoniae* in healthy turkish infants. *J. Infect.*, v. 56, n. 5, p. 332-339, 2008.

OSELKA G. Prevenção da doença pneumocócica no Brasil. **J. Pediatr** 195-196;79(3), 2003.

PAI, R.; GERTZ, R. E.; BEALL, B. Sequential Multiplex PCR Approach for Determining Capsular Serotypes of *Streptococcus pneumoniae* isolates. **J. Clin Microbiol.** v. 44, n. 1. P. 124-131, 2006.

PATEL, R. Biofilms and Antimicrobial Resistance. **Clinical Orthopaedics and Related Research**, v.437: p.41–47, 2005.

PATON, JAMES. The contribution of pneumolysin to the pathogenicity of *Streptococcus pneumoniae*. **Trends in Microbiology**. n. 4, p.103-106, mar.1996.

PAVIA, A. T. Viral Infections of the Lower Respiratory Tract: Old Viruses, New Viruses, and the Role of Diagnosis. **Clinical Infectious Diseases**. v. 52, p. 284–289, 2011.

PEPPOLONI, Samuele *et al.* The encapsulated strain TIGR4 of *Streptococcus pneumoniae* is phagocytosed but is resistant to intracellular killing by mouse microglia. **Microbes and Infection**. n. 12, p. 990-1001, nov. 2010.

PIMENTA, F.C.; CARVALHO, M. D. A. G.; GERTZ, R. E. JR. Serotype and genotype distributions of pneumococcal carriage isolates recovered from Brazilian children attending day-care centres, in **J Med Microbiol**. p. 1455-9, 2011.

PLETZ, M. W.; MAUS, U., et al. Pneumococcal vaccines: mechanism of action, impact on epidemiology and adaption of the species. **Int. J. Antimicrob. Agents**, v. 32, n. 3, p. 199-206, apr. 2008.

PLOTKOWSKI M. C.; PUCHELLE, E.; BECK, G.; JAQUOT, J.; HANNOUN. Adherence of type 1 *Streptococcus pneumoniae* to tracheal epithelium of mice infected with influenza A/PR8 virus(1-3). **Am Rev Respir Dis.**, 134; 1040-1044, 1986.

POLL, TOM VAN DER.; OPAL, STEVEN. Pathogenesis, treatment, and prevention of pneumococcal pneumonia. **Lancet**. n. 374, p. 1543-1556, 2009. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/19880020>>. Acesso em 10 de dezembro de 2014.

POST, C. L.; VICTORA, C. G.; VALENTE, J. G.; LEAL M.D.C.; NIOBEY, F. M.; SABROZA P. C. P. Fatores prognósticos de letalidade hospitalar por diarreia ou pneumonia em menores de um ano de idade. Estudo de caso e controle. **Rev. Saúde Pública**. 26(6):369-78, 1992.

PRADO, VALERIA. Conceptos microbiológicos de *Streptococcus pneumoniae*. **Revista Chilena de Infectologia**. Santiago, n. 18, p. 6-9, 2001. Disponível em: Acesso em 10 de dezembro de 2014.

PRIETSCH, S. O.; FISCHER, G. B.; CESAR J. A.; FABRIS, A. R.; MEHANNA, H.; FERREIRA, T. H. Doença aguda das vias aéreas inferiores em menores de cinco anos: influência do ambiente doméstico e do tabagismo materno. **J Pediatr (Rio-RJ)**, 78(5):415-22, 2002.

PRITCHARD, D.; *et al.* The bifunctional peptidoglycan lysin of *Streptococcus agalactiae* bacteriophage B30. **Microbiology**. n.150, p.2079-2087, jul. 2004. Disponível em: < <http://mic.sgmjournals.org/content/150/7/2079.long>>. Acesso em 10 de novembro de 2014.

PRINCIPI, N.; MARCHISIO, P.; SCHITO, G. C.; MANNELLI, S. Risk factors for carriage of respiratory pathogens in the nasopharynx of healthy children. Ascanius Project Collaborative Group. **Pediatr Infect Dis J.**, 18:517-23, 1999.

REGEV-YOCHAY, G.; ABULLAISH, I.; MALLEY, R.; SHAINBERG, B.; VARON, M.; ROYTMAN, Y.; ZIV, A.; GORAL, A.; ELHAMDANY, A.; RAHAV, G.; RAZ, M. *Streptococcus pneumoniae* Carriage in the Gaza Strip. M. Collaborative P-I, **PLoS One**, 7 (4), 2012.

REIS, J. N.; PALMA, T.; RIBEIRO G. S.; PINHEIRO, R. M.; RIBEIRO, C. T.; CORDEIRO, S. M.; DA SILVA FILHO, H. P.; MOSCHIONI, M.; THOMPSON, T. A.; SPRATT, B.; RILEY, L. W.; BAROCCHI, M. A.; REIS, M. G.; KO, A.I. Transmission of *Streptococcus pneumoniae* in an urban slum community. **J Infect.**, 57 (3), 204-213, 2008.

REY, L. C.; WOLF, B.; MOREIRA J. L.; VERHOEF, J.; FARHAT, C. K. S. *pneumoniae* isolados da nasofaringe de crianças saudáveis e com pneumonia: taxa de colonização e suscetibilidade aos antimicrobianos. **J Pediatr (Rio-RJ)**, 78:105-12, 2002.

RIVERA-OLIVERO.; BOGAERD.; BELLO, T.; NOGAL, T.; SLUIJTER, M.; HERMANS, P. W.; WAARD, J. H. pneumococcal carriage among indigenous warao colonizing preschool-age children attending day care centers in lisbon, Portugal: children in venezuela: serotypes susceptibility patterns and molecular epidemiology. **clin. infect. dis.**, c. 45, n. 11. p. 1427-1434, 2007.

RIVERA-OLIVERO, I. A.; BLOMMAART, M.; BOGAERT, D.; HERMANS, P. W.; DE WAARD, J. H. Multiplex PCR reveals a high rate of nasopharyngeal pneumococcal 7-valent conjugate vaccine serotypes co-colonizing indigenous Warao children in Venezuela. **J Med Microbiol.**, 58 (Pt 5), 584-587, 2009.

ROCHE, A. HEATH, P. T.; SHARLAND, M.; STRACHAND, D.; BREATHNACH, A.; HAIGH, T.; YOUNG, Y. Prevalence of nasopharyngeal carriage of pneumococcus in preschool children attending day care in London. **Arch. Dis. Child.**, v. 92, n. 12, p. 1073-1086, 2007.

RODRIGUES, J. C.; FILHO, LUIZ VICENTE FERREIRA DA SILVA.; BUSH, ANDREW. Diagnóstico etiológico das pneumonias - uma visão crítica. **J Pediatr (Rio RJ)**, 78 (Supl.2): S129-S140, 2002.

RODRIGUES, F.; NUNES, S.; SA-LEAO, R.; GONCALVES, G.; LEMOS, L.; DE LENCASTRE, H. *Streptococcus pneumoniae* nasopharyngeal carriage in children attending day-care centers in the central region of Portugal, in the era of 7-valent pneumococcal conjugate vaccine. **Microb Drug Resist**, 15 (4), 269-277, 2009.

ROMLING, U.; BALSALOBRE, C. Biofilm infections, their resilience to therapy and innovative treatment strategies. **Journal of Internal Medicine**, v. 272: p.541–561, 2012.

ROSSI, A.; RUVUNSKY, R.; REGUEIRA, M. Distribution of capsular types and penicilina-resistance of strains of *Streptococcus pneumonia* causing sysemi infections in argentinian children under 5 yers of age. **Microbial drug Resistance.**, 135-140, 1997.

ROSSI, F.; ANDREAZZI, D.; MAFFUCCI, M.; PEREIRA, A. A. Susceptibility of *S. pneumoniae* to various antibiotics among strains isolated from patients and healthy carriers in different regions of Brazil (1999-2000). **Braz J Infect Dis.**, 5:305-12, 2001.

RUBINS.; JEFFREY.; JANOFF.; EDWARD. Pneumolysin: A multifunctional pneumococcal virulence factor. **Journal of Laboratory and Clinical Medicine**. n. 131, p. 21-27, jan.1998.

SANCHEZ, C. J.; SHIVSHANKAR, P.; STOL, K.; TRAKHTENBROIT, S.; SULLAM, P.M.; SAUER, K. The pneumococcal serine-rich repeat protein is an intra-species bacterial adhesin that promotes bacterial aggregation *in vivo* and in biofilms. **PLoS Pathog** 6: e 1001044, 2010.

SANDERSON, A. R.; LEID, J.G.; AND HUNSAKER, D. Bacterial biofilms on the sinus mucosa of human subjects with chronic rhinosinusitis. **Laryngoscope.**, 116: 1121–1126, 2006.

SA-LEAO, R.; SIMOES A. S.; NUNES, S.; SOUSA, N. G.; FRAZAO, N.; DE LENCASTRE, H. Identification, prevalence and population structure of non-typable *Streptococcus pneumoniae* in carriage samples isolated from preschoolers attending day-care centres. **Microbiology**, 152 (Pt 2), 367-376, 2006.

SA-LEAO, R.; NUNES, S.; BRITO-AVO, A.; FRAZAO, N.; SIMOES, A. S.; CRISOSTOMO, M. I.; PAULO, A. C.; SALDANHA, J.; SANTOS-SANCHES, I.; DE LENCASTRE H. Changes in pneumococcal serotypes and antibiotypes carried by vaccinated and unvaccinated day-care centre attendees in Portugal, a country with widespread use of the seven-valent pneumococcal conjugate vaccine. **Clin Microbiol Infect.**, 15 (11), 1002-1007, 2009.

SADOWY, E.; SKOCZYNSKA, A.; FIETT, J.; GNIADKOWSKI, M.; HRYNIEWICZ, W. Multilocus Sequence Types, Serotypes, and variants of the Surface Antigen PspA in *Streptococcus pneumoniae* Isolates from Meningitis patients in Poland. **Clinical and vaccine Immunology**, 13:139-144, 2006.

SALGADO, R. M. P.; AGUERO, F. C. M. Perfil de pacientes pediátricos atendidos na emergência de um hospital universitário. **Pediatria**, São Paulo, v. 32, n. 2, p. 90-97, 2010.

SALVADOR FILHO, E. F.; TENÓRIO, D. A.; DUTRA, E. G. Perfil epidemiológico dos pacientes pediátricos com diagnóstico de pneumonia na Associação Beneficente de Campo Grande - MS/Santa Casa. **Pediatria Moderna**, v. 47, n. 1, p. 13-20, 2011.
SANCHEZ, C. J.; KUMAR, N.; LIZCANO, A.; SHIVSHANKAR, P.; HOTOPP, J. C. D.; JORGENSEN, J. H.; TETTELIN, H.; ORIHUELA, C. J. *Streptococcus pneumoniae* in biofilms are unable to cause invasive disease due to altered virulence determinant production. **PLoS ONE**, v. 6, n.12, p.2873-2878, 2011.

SAUKKORIPI, A.; LESKELA, K.; HERVA, E.; LEINONEN, M. *Streptococcus pneumoniae* in nasopharyngeal secretions of healthy children: comparison of real-time PCR and culture from STGG-transport medium. **Mol Cell Probes**, 18 (3), 147-153, 2004.

SCHAUDINN, C.; STOODLEY, P.; KAINOVIC, A.; O'KEEFFE, T.; COSTERTON, B.; ROBINSON, D. Bacterial biofilms, other structures seen as mainstream concepts. **Microbe**, 2: 231–237, 2007.

SIMELL, B.; AURANEN, K.; KÄYHTY, H.; GOLDBLATT, D.; DAGAN, R.; O'BRIEN, K. L.; MORE, R. The fundamental link between pneumococcal carriage and disease. **Expert. Rev. Vac.**, v.11, n.7, p.841–855, jul. 2012.

SOTO, S. M. Role of efflux pumps in the antibiotic resistance of bacteria embedded in a biofilm. Virulence, **ELS**. v.4, n.3: p.223–229, 2013.

SCHRAG, S.; BEALL, B. E.; DOWELL, S. Limiting the spread of resistant pneumococci: biological and epidemiological evidence for the effectiveness of alternative interventions. **Clin Microbiol Rev.**, 13: 588-601, 2000.

SMITH, A. M.; KLUGMAN, K. P. Alterations in PBP 1A essential-for high-level penicillin resistance in *Streptococcus pneumoniae*. Antimicrob. **Agents Chemother**, v. 42, n. 6, p. 1329-1333. Jan. 1998.

SMITH, A. W. Biofilms and antibiotic therapy: Is there a role for combating bacterial resistance by the use of novel drug delivery systems? **Advanced Drug Delivery Reviews**, v.57: p.1539–1550, 2005.

SPRATT, B. G.; HANAGE, W. P.; FEIL, E. J. The relative contributions of recombination and point mutation to the diversification of bacterial clones. **Current opinion in microbiology**, 4 (5), 602-606, 2001.

STANHOPE, M. J.; WALSH, S. L.; BECKER, J. A.; ITALIA, M. J.; INGRAHAM, K. A.; GWYNN, M. N.; MATHIE, T.; POUPARD, J. A.; MILLER, L. A.; JAMES R. BROWN, J. R.; AND HEATHER AMRINE-MADSEN, H. Molecular Evolution Perspectives on Intraspecific Lateral DNA Transfer of Topoisomerase and Gyrase Loci in *Streptococcus pneumoniae*, with Implications for Fluoroquinolone Resistance Development and Spread. **Antimicrobial Agents And Chemotherapy**, v. 49, n. 10, p. 4315–4326, 2005.

STEPANOVIC, S.; VUKOVIC, D.; HOLA, V.; BONAVENTURA, G.; DJUKIC, S.; IRKOVIC, I.C.; RUZICKA, F. Quantification of biofilm in microtiter plates: overview of testing conditions and practical recommendations for assessment of biofilm production by *staphylococci*. **APMIS**. 71 (5), 687-690, 2007.

STRATCHOUNSKI, L. S.; KOZLOV R. S.; APPELBAUM P. C.; KRETCHIKOVA O. I.; KOSOWSKA-SHICK, K. Antimicrobial resistance of nasopharyngeal pneumococci from children from day-care centres and orphanages in russia: results of a unique prospective multicentre study. *clin. microbiol. infect.*, v. 12 n. 9 p. 853-866, 2006.

TCHIDJOU, H. K.; VERCIO, F.; BOROS, S.; GUEMKAM, G.; MINKA, E.; LOBE, M.; CAPPELLI, G.; COLIZZI, V.; TIETCHE, F.; REZZA, G. Seasonal Pattern of Hospitalization from Acute Respiratory Infections in Yaounde, Cameroon. **J. Trop. Pediatr.**, v 56, n. 5, p. 317-320, 2010.

TEIXEIRA, L. M.; CARVALHO, M. G.; CASTINEIRAS, T. M.; FRACALANZZA, S. A.; LEVIN, A. S.; FACKLAM, R. R. Serotyping distribution and antimicrobial resistance of *Streptococcus pneumoniae* isolated in Brazil (1992–1996). **Adv Exp Med Biol**, 418:269–71, 1997.

TOMASZ, A. Antibiotic resistance in *Streptococcus pneumoniae*. **Clin Infect Dis.**, 24:S85-S88, 1997.

TORRES, N.; VELÁSQUEZ, R.; MERCADO, E. H.; EGOAVIL, M.; HORNA, G.; MEJÍA, L. Resistencia antibiótica de *Streptococcus pneumoniae* en portadores nasofaríngeos sanos de siete regiones del Perú. **Rev Peru Med Exp Salud Publica**. 30(4):575-82, 2013.

TRAPPETTI, C.; KADIOGLU, A.; CARTER, M.; HAYRE, J.; IANNELLI, F.; POZZI, G. Sialic acid: a preventable signal for pneumococcal biofilm formation, colonization, and invasion of the host. **J Infect Dis.**, 199: 1497–1505, 2009.

TUOMANEN, E. I. AUSTRIAN, R.; MASURE, R. Mechanisms of disease. **The New England Journal of Medicine**, v. 332 p. 1280-1284, 1995.

TUOMANEN E. I. The biology of pneumococcal infection. **Pediatr Res.**, 42: 253–58, 1997.

VALENTE, C.; HINDS, J.; PINTO, F.; BRUGGER, S. D.; GOULD, K.; MUHLEMANN, K.; DE LENCASTRE, H.; SA-LEAO, R. Decrease in pneumococcal co-colonization following vaccination with the seven-valent pneumococcal conjugate vaccine. **PLoS One.**, 7 (1), e30235, 2012.

VALENZUELA, M. E.; FLANNERY B. La epidemiología numocócica global. En: Organización Panamericana de la Salud. Acta del Segundo Simposio Regional sobre Neumococo. Procedente del II Simposio Regional de Enfermedad Neumocócica. 13 y 14 de diciembre de 2006. São Paulo, Brasil. Geneva: OPS;2006.

VALENZUELA MT, O'LOUGHLIN R, DE LA HOZ F, GOMEZ E, CONSTENLA D, SINHA A, VALENCIA JE, FLANNERY B, DE QUADROS CA. The burden of pneumococcal disease among Latin American and Caribbean children: review of the evidence. **Rev Salud Panam Publica.** 25(3):270–9, 2009.

VELASQUEZ, P. A.; PARUSSOLO, L.; CARDOSO, C. L.; TOGNIM, M. C.; GARCIA, L. B. High prevalence of children colonized with penicillin-resistant *Streptococcus pneumoniae* in public day-care centers. **J Pediatr (Rio RJ).** 85(6):516-522, 2009.

VLASICH. C. Pneumococcal Infection and vaccination in the elderly. **Vaccine**, v.19 n.17-19, p. 2223-2227, 2001.

VICTORA, C. G.; FUCHS, S. C.; FLORES, J. A. C.; FONSECA, W.; KIRKWOOD, B. Risk factors for pneumonia among children in a Brazilian metropolitan area. **Pediatrics.** 93(6 Pt 1):977-85, 1994.

WAITE, R. D.; STRUTHERS, J. K.; and DOWSON, C. G. Spontaneous sequence duplication within an open reading frame of the pneumococcal type 3 capsule locus causes highfrequency phase variation. **Mol Microbiol.**, 42: 1223–1232, 2001.

WHITNEY, C. G.; FARLEY, M. M., et al. Decline in invasive pneumococcal disease after the introduction of protein-polysaccharide conjugate vaccine. **N. Engl. J. Med.**, v.348, n.18, p.1737-1746, 2003.

WOODS, C. R. Acute bacterial pneumonia in childhood in the current era. **Pediatr Ann**, v. 37, n. 10, Oct, p. 694-702. 2008.

WORLD HEALTH ORGANIZATION (WHO). Progress in introduction of Pneumococcal Conjugate Vaccine-Worldwide, 2000-2012. Morbidity and Mortality Weekly Report 2013, 62: 308-11. Disponível em: <http://www.who.int>. Acesso em 2013.

WORLD HEALTH ORGANIZATION (WHO). Immunization surveillance, assessment and monitoring: Estimated Hib and pneumococcal deaths children under 5 years of age, 2000.Fonte:http://www.who.int/immunization_monitoring/Burden/Pneumo_hib_estimates_2000/en/index.html. Acesso em 2013.

WORLD HEALTH ORGANIZATION (WHO). **Acute Respiratory Infection** (Updated September, 2009). Disponível em: http://www.who.int/vaccine_research/diseases/ari/en. Acesso em 10 de setembro de 2014.

WOLF, B.; REY, L. C.; BRISSE, S.; MOREIRA, L. B.; MILATOVIC, D.; FLEER, A.; ROORD, J. J.; VERHOEF, J. Molecular epidemiology of penicillin-resistant *Streptococcus pneumoniae* colonizing children with community-acquired pneumonia and children attending day-care centres in Fortaleza, Brazil. *J Antimicrob Chemother*, 46 (5), 757-765, 2000.

WOLCOTT, R. D.; and EHRLICH, G. D. Biofilms and chronic infections. **JAMA**, 299: 2682–2684, 2008.

WROE, P. C.; LEE, G. M.; FINKELSTEIN, J. A.; PELTON, S. I.; HANAGE, W. P.; LIPSITCH, M.; STEVENSON, A. E.; RIFAS-SHIMAN, S. L.; KLEINMAN, K.; DUTTALINN, M. M.; HINRICHSEN, V. L.; LAKOMA, M.; HUANG, S. S. Pneumococcal Carriage and Antibiotic Resistance in Young Children Before 13-valent Conjugate Vaccine. **Pediatric Infectious Disease Journal**. 31 (3), 249-254, 2012.

ZEMLICKOVA, H.; URBASKOVA, P.; ADAMKOVA, V.; MOTLOVA, J.; LEBEDOVA, V.; PROCHAZKA, B. Characteristics of *Streptococcus pneumoniae*, *Haemophilus influenzae*, *Moraxella catarrhalis* and *Staphylococcus aureus* isolated from the nasopharynx of healthy children attending day-care centres in the Czech Republic. **Epidemiol Infect.**, 134 (6), 1179-1187, 2006.

ZENNI M. K, CHEATHAM S. H, THOMPSON J.M, REED G. W, BATSON A. B, PALMER O.S. *Streptococcus pneumoniae* colonization in the young child: association with otitis media and resistance to penicilin. **J Pediatr**. 127:533-7, 1995.

ANEXOS

ANEXO I



Centro de Pesquisa em Medicina Tropical
Comitê de Ética em Pesquisa

REF.: Parecer 17/11 CEP/CEPEM
CAAE: 0007.0.046.000-11


Porto Velho, 31 de Agosto de 2011.

Ilmo. Dra. Deusilene Souza Vieira
Instituição: CEPEM/IPEPATRO

Sra. Pesquisadora, em sua Sexta reunião realizada no dia **18 de Agosto de 2011**, a Comissão de Ética do Centro de Pesquisa em Medicina Tropical - CEPEM, atendendo sua solicitação, analisou o projeto sob sua responsabilidade intitulado: **"Perfil epidemiológico e molecular das infecções agudas respiratórias em população infantil na região metropolitana de Porto Velho-RO"**. Informo que, após análise e discussão a Comissão de Ética considerou **APROVADO**, o citado projeto.

De acordo com o item VII.13.d, da resolução CNS nº 196/96, V.S^a. deve encaminhar a nossa secretaria relatórios parcial e final do referido projeto enquanto durar a pesquisa.

Atenciosamente,


Dra. Carla Freire Celedonio Fernandes
Coordenadora do Comitê de Ética em Pesquisa – CEP/CEPEM

Centro de Pesquisa em Medicina Tropical –CEPEM
Comitê de Ética em Pesquisa com Seres Humanos - CEP
Aprovado pela Comissão Nacional de Ética em Pesquisa – CONEP
Av Guaporé, 215 - Lagoa Telefone: 3219-6012 / 32165442
Porto Velho – RO



ANEXO II**TERMO DE CONSENTIMENTO LIVRE E ESCLARECIDO – TCLE**

VOCÊ ESTÁ SENDO CONVIDADO (A) COMO VOLUNTÁRIO (A) A PARTICIPAR DA PESQUISA:

PERFIL EPIDEMIOLÓGICO DAS INFECÇÕES AGUDAS RESPIRATÓRIAS EM POPULAÇÃO INFANTIL NA REGIÃO METROPOLITANA DE PORTO VELHO – RO A JUSTIFICATIVA, OS OBJETIVOS E OS PROCEDIMENTOS:

Este projeto visa determinar a prevalência e conhecer o perfil etiológico das infecções agudas respiratórias, sendo o isolamento do patógeno envolvido o fator crucial relacionados às decisões terapêuticas e profiláticas. Este estudo será útil para a estruturação dos diferentes níveis de atendimento de saúde para os períodos de pico destas infecções. Os métodos utilizados neste estudo para identificação desses patógeno, seja viral e/ou bacteriano poderá contribuir para redução do número e do período de hospitalizações, na racionalização do uso de antibióticos e, finalmente, na indicação de uma terapia antiviral para casos específicos. Temos como objetivo determinar através do estudo transversal a prevalência das doenças respiratórias infantis na região de Porto Velho-RO e caracterizar os agentes etiológicos virais e/ou bacterianas responsáveis por estas infecções. Os procedimentos de coleta de material e dados serão da seguinte forma: Quando o responsável pelo voluntário sadio aceitar a participar da pesquisa, este receberá o TCLE, e as explicações sobre a pesquisa. A seguir será coletado cerca de 50uL de secreção nasofaríngea (SNF) pelo médico responsável pela consulta por *swab*.

DESCONFORTOS, RISCOS E BENEFÍCIOS:

Existe um leve desconforto, no momento da coleta da secreção nasal justificado para que se possa realizar o procedimento de isolamento viral.

GARANTIA DE ESCLARECIMENTO, LIBERDADE DE RECUSA E GARANTIA DE SIGILO:

Você será esclarecido(a) sobre a pesquisa em qualquer aspecto que desejar. Você é livre para recusar-se a participar, retirar seu consentimento ou interromper a participação a qualquer momento. A sua participação é voluntária e a recusa em participar não irá acarretar qualquer penalidade ou perda de benefícios.

Os pesquisadores irão tratar a sua identidade com padrões profissionais de sigilo. Os resultados das pesquisas que serão realizadas dentro de laboratório serão guardados e poderão ser enviados para você e permanecerão confidenciais. Seu nome ou o material que indique a sua participação não será liberado sem a sua permissão. Você não será identificado (a) em nenhuma publicação que possa resultar desse estudo. Uma cópia deste consentimento informado será arquivada no Centro de Pesquisa em Medicina Tropical e outra será fornecida a você.

CUSTOS DA PARTICIPAÇÃO, RESSARCIMENTO E INDENIZAÇÃO O POR EVENTUAIS DANOS:

A participação no estudo não acarretará custos para você e não será disponível nenhuma compensação financeira adicional.

DECLARAÇÃO DO (A) PARTICIPANTE (A) OU DO SEU RESPONSÁVEL:

Eu, _____, fui informada(o) dos objetivos da pesquisa acima, de maneira clara e detalhada e esclareci minhas dúvidas. Sei que qualquer momento poderei solicitar novas informações e motivar minha decisão se assim o desejar. O pesquisador certificou-me de que todos os dados desta pesquisa serão confidenciais.

Também sei que caso existam gastos adicionais, estes serão absorvidos pelo orçamento da pesquisa. Em caso de dúvidas poderei chamar os pesquisadores, no telefone ou e-mail:

-Dr. Mauro Sughero Tada (maurotada@gmail.com) – 32196012

-Dra Deusilene Vieira (deusylenebio@hotmail.com) – 9903-9000

-Dra Najla Benevides Matos (najla_matos@yahoo.fr) -3219-6019

-MSc Alcione de Oliveira dos Santos (alcione.m@hotmail.com) – 99650387

Declaro que recebi uma cópia deste termo de consentimento livre e esclarecido e me foi dada a oportunidade de ler e esclarecer as minhas dúvidas.

Nome	Assinatura do participante ou digital	Data
------	---------------------------------------	------

Nome	Assinatura do Pesquisador	Data
------	---------------------------	------

ANEXO III

DATA do preenchimento deste questionário: ____/____/____		<div style="border: 1px solid black; width: 100px; height: 20px; margin: 0 auto;"></div> Código do Paciente	
FICHA DE INVESTIGAÇÃO EPIDEMIOLÓGICA			
OBJETIVO: Estudo etiológico e epidemiológico de infecções respiratórias e diarreicas em população infantil no município de Porto Velho - Rondônia.			
DADOS DA CRIANÇA			
Nome completo da criança:		Data de nascimento: [] / [] / []	Idade (anos): []
Sexo: 1-M; 2-F			
Etnia: [] 1-branca, 2-parda, 3-negra, 4-índio, 5-amarela, 6-outros			
Naturalidade da(cidade): UF	Nacionalidade (país):	Telefone residencial:	
Tempo de residência em RO (anos):	Tempo de residência no município (anos):	Última procedência: cidade	UF (meses)
Endereço da criança (Rua/Av, número, bairro, cidade, UF):			
Onde a criança passa a maior parte do tempo? () Própria Casa () Cheche () Escola Na última semana que antecedeu ao IRA onde a criança passou a maior parte do tempo? () Própria Casa () Cheche () Escola () Outra casa com outras crianças () viagem			
Quantas pessoas moram com a criança (Em números)? () crianças () Adultos			
DADOS DA MÃE OU RESPONSÁVEL			
Nome completo da mãe ou responsável:			
RG da mãe ou responsável: []		SSP []	Telefone celular:
Instrução (1º, 2º, 3º grau): []		Renda familiar (R\$)	Ocupação principal:
DADOS DA MORADIA			
CASA	PAREDES	[] alvenaria [] barro [] madeira [] lona []	
	CHÃO	[] cerâmica [] madeira [] cimento [] terra	
	FORRO	[] sim [] não	
	CÔMODOS	Quantidade: []	
	TELA	[] sim [] não	
	BANHEIRO	[] fora [] dentro [] mato [] rio / igarapé	
FOSSA	[] fossa séptica [] fossa negra		
Quantos compartimentos tem a casa?	Quantas pessoas dormem em casa com a criança?	A casa possui ventilação normal? [] Sim [] Não	Quantas janelas?
Qual tipo de aparelho é utilizado para ventilar o dormitório? [] Ventilador [] Ar condicionado [] Não utiliza			
ÁGUA para consumo	[] poço [] rio / igarapé [] mina [] chuva [] mineral / comprada		
	[] filtrada [] clorada [] fervida [] s/ tratamento		
Armazenada em:			
ÁGUA para banho	[] poço [] rio / igarapé [] mina [] chuva [] mineral / comprada		
	[] filtrada [] clorada [] fervida [] s/ tratamento		
ANIMAIS	[] cão [] gato [] galinha [] pato [] porco [] gado		
	[] carneiro [] macaco [] outro (especificar):		
Outras informações pertinentes:			

A criança teve IRA no último mês ?	<input type="checkbox"/> 1-sim <input type="checkbox"/> 2-não	A criança ficou internada ?	<input type="checkbox"/> 1-sim <input type="checkbox"/> 2-não	A criança foi medicada ?	<input type="checkbox"/> 1-sim <input type="checkbox"/> 2-não
Se a criança teve IRA quais foram os principais sintomas ?	Tosse	<input type="checkbox"/>	1-sim 2-não	Dor de ouvido	<input type="checkbox"/> 1-sim 2-não
	Coriza	<input type="checkbox"/>	1-sim 2-não	Chiado no Peito	<input type="checkbox"/> 1-sim 2-não
	Peito cheio	<input type="checkbox"/>	1-sim 2-não	Falta de ar	<input type="checkbox"/> 1-sim 2-não
	Febre	<input type="checkbox"/>	1-sim 2-não	Respiração difícil	<input type="checkbox"/> 1-sim 2-não
	Obstrução nasal	<input type="checkbox"/>	1-sim 2-não	Prurido ocular	<input type="checkbox"/> 1-sim 2-não
Antecedentes familiares	Asma <input type="checkbox"/> Rinite <input type="checkbox"/>	Tuberculose <input type="checkbox"/>	Fumo passivo <input type="checkbox"/>	1-sim 2-não	
Principais sintomas atuais	Tosse	<input type="checkbox"/>	1-sim 2-não	Dor de ouvido	<input type="checkbox"/> 1-sim 2-não
	Coriza	<input type="checkbox"/>	1-sim 2-não	Chiado no Peito	<input type="checkbox"/> 1-sim 2-não
	Peito cheio	<input type="checkbox"/>	1-sim 2-não	Falta de ar	<input type="checkbox"/> 1-sim 2-não
	Febre	<input type="checkbox"/>	1-sim 2-não	Respiração difícil	<input type="checkbox"/> 1-sim 2-não
	Obstrução nasal	<input type="checkbox"/>	1-sim 2-não	Prurido ocular	<input type="checkbox"/> 1-sim 2-não
A quanto tempo iniciou os sintomas ?					
A criança tomou em casa algum medicamento ?	<input type="checkbox"/> 1-sim <input type="checkbox"/> 2-não Qual _____				
A criança está tomando algum medicamento ?	<input type="checkbox"/> 1-sim <input type="checkbox"/> 2-não Qual _____				
A criança foi amamentada ?	<input type="checkbox"/> 1-sim <input type="checkbox"/> 2-não				
A criança mama no peito ?	<input type="checkbox"/> 1-sim <input type="checkbox"/> 2-não				
Se já foi desmamada, Idade do desmame ? _____ meses ; _____ anos					
O Parto foi normal ou cesariana ?	Normal <input type="checkbox"/> 1-sim 2-não Cesariana <input type="checkbox"/> 1-sim 2-não				
Exame antropométrico atuais	Peso _____ Kg Altura _____ Cm				
Outras informações pertinentes:					
Clima atual ? () Chuvoso () Ensolarado () Nublado () Seco					
Este questionário foi respondido pelo(a) <input type="checkbox"/> 1-participante 2-mãe 3-outro responsável					
Nome e assinatura do entrevistador			Visto da Supervisão		